



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0050679
(43) 공개일자 2018년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/32 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C07K 14/33* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/32 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7008537

(22) 출원일자(국제) 2016년08월26일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년03월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/049099

(87) 국제공개번호 WO 2017/035507

국제공개일자 2017년03월02일

(30) 우선권주장

62/210,610 2015년08월27일 미국(US)

(71) 출원인
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17

메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77

(72) 벌명자
콜리어 알. 존

미국 메사추세츠주 02481 웨즐리 가든 로드 43
치우 이삭

미국 메사추세츠주 02445 브루클라인 글렌 로드
81 유닛 에스1

펜텔트 브레들리 엘.

미국 메사추세츠주 02139 캠브리지 아모리 스트리트 108 유닛 1

(74) 대리인
문두현

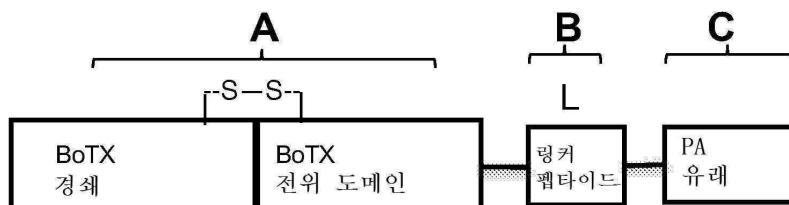
전체 청구항 수 : 총 174 항

(54) 발명의 명칭 통증 치료용 조성물 및 방법

(57) 요약

통각수용체 뉴런에 결합하고 이를 표적화하는 조작된 융합 단백질, 이 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물 및 조작된 융합 단백질을 함유하는 이 조작된 융합 단백질 또는 조성물을 사용하여 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 구현되어 있다. 조작된 융합 단백질은 단백질 독소, 예컨대 탄저병 독소, 독소의 클로스트리듐 보툴리눔 패밀리, 다이설파이드 함유 독소, 및 AB 성분 유형 독소로부터 유래한 도메인을 함유한다.

대 표 도 - 도7a



A: 기공 형성 및 전위에
필요한 보툴리눔 신경독소
경쇄 및 중쇄의 일부

1. BoNT/A (a.a. 1-872)
2. BoNT/A (a.a. 1-842)
3. BoNT/B (a.a. 1-863)

B:
링커

1. PA 도메인 4 (PA a.a. 596-735)
2. 퓨린 절단 부위에 대한
PA 돌연변이체

C:

(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

C07K 14/33 (2013.01)

C12N 9/50 (2013.01)

C07K 2319/55 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

융합 단백질로서,

- a) 보툴리눔 신경독소(botulinum neurotoxin: BTx) 또는 파상풍 신경독소(tetanus neurotoxin: TTx), 및
 - b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하되,
- 파트 (a) 및 (b)는 함께 연결되거나 융합된, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 BTx 또는 TTx는 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 신호를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 BTx 효소 모이어티 또는 전위 신호는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 임의의 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 또는 전위 신호는 표 1에서 발견된 각각의 LC 효소 모이어티 또는 H_N 전위 펩타이드로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 파트 (a) 및 (b), 또는 상기 효소 모이어티 및 전위 펩타이드는 링커 펩타이드에 의해 연결된, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PAd4 도메인, PAd2 및 PAd4 도메인 또는 PA63을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 PA 또는 상기 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 프로테아제에 의한 절단에 저항성인, 융합 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 PA 또는 상기 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 퓨린 절단 또는 Lys C 절단 또는 둘 다에 저항성인, 융합 단백질.

청구항 13

융합 단백질로서,

- a) 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있는 비세포독성 프로테아제; 및
 - b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질을 포함하되,
- 상기 PA 또는 단편은 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는, 융합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 비세포독성 프로테아제는 클로스트리듐 신경독소 L 사슬을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 클로스트리듐 신경독소는 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx)인, 융합 단백질.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 클로스트리듐 신경독소 L 사슬은 표 1로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 상기 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.

청구항 18

제13항에 있어서, 상기 PA에 결합할 수 있는 단백질은

- i) 탄저병 독소 치사 인자(LF); 또는
- ii) 탄저병 독소 부종 인자(EF)인, 융합 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, LF의 PA 결합 도메인은 (LFPABD 또는 LFn이라 축약된) LF의 N 말단 도메인인, 융합 단백질.

청구항 20

제18항에 있어서, EF의 PA 결합 도메인은 (EFPABD 또는 EFn이라 축약된) EF의 N 말단 도메인인, 융합 단백질.

청구항 21

융합 단백질로서,

- a) 통각수용체 뉴런에서 이온 채널을 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소(이것은 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소를 포함함); 및
- b) 상기 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(targeting moiety: TM)이되, 상기 통각수용체 뉴런은 내부에 상기 이온 채널(예를 들어, 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 둘 다)을 발현하는, 표적화 모이어티를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 코노톡신(conotoxin), 아가톡신(agatoxin), 델타-팔루톡신(delta-palutoxin), 후웬토톡신(huwentotoxin) 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 TM은

- i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA);
- ii) PA의 C 말단 수용체 결합 도메인;
- iii) 통각수용체 뉴런 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 상기 ANTXR2(CMG2) 수용체와 상호작용하고 이에 결합하는, 융합 단백질.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 PA는 퓨린 절단에 저항성인 돌연변이체 또는 변이체 PA인, 융합 단백질.

청구항 27

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA63 또는 PAd4이거나, PAd2 및 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 PAd4는 프로테아제에 의한 절단에 저항성인, 융합 단백질.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 프로테아제는 퓨린 또는 Lys C인, 융합 단백질.

청구항 30

제24항에 있어서, 상기 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체인, 융합 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 신경 성장 인자 수용체, ANTXR2 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합하는, 융합 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 33

융합 단백질로서,

- a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소(이것은 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소임); 및
- b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질을 포함하되,

상기 단편은 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는, 융합 단백질.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 텔타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 상기 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.

청구항 37

제33항에 있어서, 상기 PA에 결합할 수 있는 단백질은

- i) 탄저병 독소 치사 인자(LF); 또는
- ii) 탄저병 독소 부종 인자(EE)인, 융합 단백질.

청구항 38

융합 단백질로서,

- a) AB 독소;
- b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편이되, 상기 PA 또는 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는, 상기 PA 또는 단편; 및
- c) 엔도솜 내로부터 상기 엔도솜 막에 걸쳐 상기 통각수용체 뉴런의 시토솔로 프로테아제를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(translocation domain: TL)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 AB 독소는

- i) 리신(Ricin) 독소,
- ii) 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트;
- iii) 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A A 파트 및 B 파트;
- iv) 쉬가(Shiga) 독소 A 파트 및 B 파트; 및
- v) 디프테리아(Diphtheria) 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 통각수용체 뉴런에서 발현된 상기 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 PA 단편은 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인인, 융합 단백질.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 TL은

- i) 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인;
- ii) 홀로톡신(holotoxin); 또는
- iii) 무효화된 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 가지는 홀로톡신의 변이체인, 융합 단백질.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 44

제43항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자인, 벡터.

청구항 46

제43항의 핵산 또는 제44항 또는 제45항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 47

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 제조하는 방법으로서,

- a) 상기 융합 단백질이 발현되는 조건에서 제46항의 세포를 배양하는 단계; 및
- b) 상기 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항의 방법에 의해 제조된 융합 단백질.

청구항 49

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 50

통증을 치료하는 방법으로서, 제49항의 조성물을 통증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 51

통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 통증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 52

탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 연결된, BTx의 N 말단 효소 도메인(L 사슬) 및 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N)을 포함하는 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 BTx 모이어티와 상기 PAd4 도메인 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 56

제53항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 57

제54항 또는 제55항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 58

제52항에 있어서, 상기 BTx 모이어티는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 제1 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 임의의 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 59

제52항에 있어서, 상기 융합 단백질은 탠덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 60

제52항에 있어서, 상기 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 상기 BTx 모이어티와 상기 PAd4 사이에 추가로 혼입된, 융합 단백질.

청구항 61

제52항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번 및 729번, 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 62

제52항에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 63

제52항에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웨타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)인, 융합 단백질.

청구항 65

제52항에 있어서, 서열 번호 1에서의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상(넘버링은 서열 번호 1로부터의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀 후의 것임)은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 66

제52항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N 말단에서의 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 67

제52항에 있어서, BTx의 L 사슬과 BTx의 H_N 사슬 사이의 연접부에 상응하는 잔기는 절단된, 융합 단백질.

청구항 68

제52항 내지 제67항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 70

융합 단백질로서,

- a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티(BTx의 L 사슬)의 보툴리눔 신경독소 N 말단 효소 도메인, 및
- b) PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(IFn)에 결합하고, PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 효소 도메인에 결합하는, 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)을 포함하되,

파트 (a)는 파트 (b)에 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결된, 융합 단백질.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 BTx 모이어티의 C 말단 측에 위치한, BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트를 한정하는 아미노산 서열을 추가로 포함하고, 상기 벨트는 L 사슬에 연결된, 융합 단백질.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 BTx H_N 도메인의 벨트와의 L 사슬 연접부에 상응하는 잔기는 절단된, 융합 단백질.

청구항 73

제71항에 있어서, 상기 BTx L 사슬에서의 Cys 잔기 및 상기 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트는 Ala, Ser 또는 Thr로 변경된, 융합 단백질.

청구항 74

제70항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 75

제70항에 있어서, 상기 BTx L 모이어티와 상기 LFn 또는 EFn 도메인 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.

청구항 77

제75항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 78

제75항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 79

제75항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Lys 또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 80

제70항 내지 제79항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 81

제80항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물

청구항 82

제80항 또는 제81항의 조성물 및 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 PA 단백질은 올리고머 PA인, 조성물.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 올리고머 PA는 상기 융합 단백질에 결합된, 조성물.

청구항 85

제80항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 86

융합 단백질로서,

b) 다이설파이드 함유 펩타이드 독소에 연결된,

a) 탄저병 독소 보호성 항원(PA); 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4); 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 저해제 시스테인 노트 독소인, 융합 단백질.

청구항 88

제86항에 있어서, 상기 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 텔타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.

청구항 89

제86항에 있어서, 상기 PA, PAd4 또는 통각수용체 결합 단백질과 상기 저해제 시스테인 노트 독소 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 91

제89항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 92

제89항에 있어서, 상기 링커 펩타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 93

제86항에 있어서, 상기 융합 단백질은 탠덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 94

제86항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 또는

PA에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 95

제94항에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 96

제86항에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 $^{164}\text{RKKR}^{167}$ 을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웨타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.

청구항 98

제86항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 또는 PA에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 99

제86항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 100

제86항에 있어서, 상기 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체인, 융합 단백질.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 신경 성장 인자 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합하는, 융합 단백질.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 103

제86항 내지 제102항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 104

제103항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 105

PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인 (EFn)에 결합하고, PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태에 결합하는, 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인 (LFn)에 대한 하나 이상의 부위에서 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 작동 가능하게 연결된, 또는 화학적으로 가교결합된, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소를 포함하는 융합 단백질.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 LFn과 상기 독소 또는 상기 EFn과 상기 독소 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 109

제107항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 110

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 111

제110항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서, 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA)을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 PA는 올리고머 PA로 있는, 조성물.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 올리고머 PA는 상기 융합 단백질에 결합된, 조성물.

청구항 115

제110항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물

청구항 116

탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 작동 가능하게 연결된 링커 웨타이드에 융합된 AB 독소를 포함하는 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질은 무효화된 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 가지는 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쉬가(Shiga) 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된, 융합 단백질.

청구항 118

제116항 또는 제117항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.

청구항 119

제116항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 120

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 121

제116항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Lys 및 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 122

제116항에 있어서, 상기 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 상기 AB 독소와 상기 PAd4 사이에 추가로 흔입된, 융합 단백질.

청구항 123

제116항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 124

제116항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 125

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 텐덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 126

제116항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 701번, 713번, 719번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인(PAd4)에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 127

제116항에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 128

제116항에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웨타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.

청구항 129

제128항에 있어서, 상기 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.

청구항 130

제114항 내지 제129항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 131

제130항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 132

탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 작동 가능하게 연결된 파상풍 신경독소 (TTx)로부터의 전위/기공 형성 도메인과 함께 N 말단 효소 도메인(사슬 A)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 TTx 모이어티와 상기 PAd4 도메인 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.

청구항 135

제134항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

청구항 136

제134항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 137

제134항에 있어서, 상기 링커 웨타이드는 Lys 또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

청구항 138

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 탠덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 139

제132항에 있어서, 상기 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 상기 BTx 모이어티와 상기 PAd4 사이에 추가로 혼입된, 융합 단백질.

청구항 140

제132항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 701번, 713번, 719번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 141

제132항에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 142

제132항에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웨타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.

청구항 143

제142항에 있어서, 상기 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.

청구항 144

제132항에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

청구항 145

제132항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

청구항 146

제132항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, TTx의 중쇄와의 TTx의 경쇄 연접부에 상응하는 잔기는 절단된, 융합 단백질.

청구항 147

제132항 내지 제146항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 148

제147항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 149

제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항 및 제132항 내지 146항 중 어느 한 항의 임의의 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 150

제149항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 백터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 바이러스 백터인, 백터.

청구항 152

제149항의 핵산 또는 제150항 또는 제151항의 백터를 포함하는 세포.

청구항 153

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 제조하는 방법으로서,

- a) 상기 융합 단백질이 발현되는 조건에서 제152항의 세포를 배양하는 단계; 및
- b) 상기 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 154

제153항의 방법에 의해 제조된 융합 단백질.

청구항 155

제1항 내지 제42항, 제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항 및 제132항 내지 146항 중 어느 한 항에 있어서, 글리이코실화된, 융합 단백질.

청구항 156

제1항 내지 제42항, 제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항 및 제132항 내지 146항 중 어느 한 항에 있어서, 비글리이코실화된, 융합 단백질.

청구항 157

제153항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포인, 방법.

청구항 158

제157항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)인, 방법.

청구항 159

제153항에 있어서, 상기 세포는 효모 세포인, 방법.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 방법.

청구항 161

제159항에 있어서, 상기 효모는 세포 글라이코실화 결핍된, 방법.

청구항 162

제159항에 있어서, 상기 효모는 글라이코실화 및 프로테아제 결핍된, 방법.

청구항 163

제153항에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포인, 방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 상기 포유류 세포는 COS 세포, CHO 세포 또는 NSO 세포인, 방법.

청구항 165

통증의 치료를 위한, 제1항 내지 제42항, 제48항, 제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항, 제132항 내지 146항 및 제154항 내지 156항 중 어느 한 항의 임의의 융합 단백질의 용도.

청구항 166

통증의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제42항, 제48항, 제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항, 제132항 내지 146항 및 제154항 내지 156항 중 어느 한 항의 임의의 융합 단백질의 용도.

청구항 167

통증을 치료하는 방법으로서, 제49항, 제68항, 제69항, 제80항 내지 제85항, 제103항, 제104항, 제110항 내지 제115항, 제130항, 제131항 및 제147항 내지 제148항 중 어느 한 항으로부터 선택된 조성물을 통증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 투여는 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 또는 중추 신경계로의 경막외 주사에 의해, 또는 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사를 사용한 말초 투여에 의해 수행되는, 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 상기 통증은 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 및 다른 전신 통증 장애로부터 선택된, 방법.

청구항 170

신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증을 치료하는 방법으로서, 제49항, 제68항, 제69항, 제80항 내지 제85항, 제103항, 제104항, 제110항 내지 제115항, 제130항, 제131항 및 제147항 내지 제148항 중 어느 한 항으로부터 선택된 조성물을 통증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사에 의해 말초로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 171

당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애를 치료하는 방법으로서, 제49항, 제68

항, 제69항, 제80항 내지 제85항, 제103항, 제104항, 제110항 내지 제115항, 제130항, 제131항 및 제147항 내지 제148항 중 어느 한 항으로부터 선택된 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체의 중추 신경계로 경막외 주사, 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 172

제167항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 제80항 내지 제85항 및 제110항 내지 제115항 중 어느 한 항의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제 내에 탄저병 보호성 항원(PA)을 포함하는 조성물을 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 투여한 후에 별개로 투여되는, 방법.

청구항 173

통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 통증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 174

통증의 치료를 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 약제학적 조성물은 제1항 내지 제42항, 제48항, 제52항 내지 제67항, 제70항 내지 제79항, 제86항 내지 제102항, 제105항 내지 제109항, 제116항 내지 제129항, 제132항 내지 146항 및 제154항 내지 156항 중 어느 한 항에 기재된 하나 이상의 융합 단백질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] * 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 (e) 하에 2015년 8월 27일자로 출원된 미국 가출원 제62/210,610호(이의 내용은 본 명세서에서 참고로 그 전문이 포함됨)의 이익을 주장한다.

서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자로 제출되고 본 명세서에서 참고로 그 전문이 포함된 서열 목록을 함유한다. 2016년 8월 26일자로 생성된 ASCII 카피는 명칭이 002806-084951-PCT_SL.txt이고, 크기가 165,499바이트이다.

기술분야

[0006] 본 발명자들은 신규한 조성물 및 통증의 치료 방법을 기재한다.

배경 기술

[0007] 골관절염, 류마티스성 관절염, 근육 경직 및 암을 포함하는 만성 질환 병태에서의 통증은 주요 사회경제적 부담이고, 이에 대해 아주 적은 효과적인 치료가 이용 가능하다.

[0008] 현재의 만성 통증 치료제, 예컨대 오피오이드는 대부분 비효과적이거나, 다른 뉴런 아형에 대한 작용으로 인해 주요한 오프-표적 효과, 예컨대 중독성을 가진다.

[0009] 통각수용체 감각 뉴런은 해로운/해를 주는 자극의 검출을 매개하고, 이의 비정상 활성화는 만성 통증을 생성한다. 이 뉴런은 과활성 감각 운동 반사기에 기여할 수 있는 근육 경직에서 이상조절되고, 또한 골관절 병태에서 이환된 관절을 자극하여 통증을 매개한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 신규한 조성물 및 통증의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은, 적어도 부분적으로, 통증 감지 통각수용체 뉴런이 탄저병 독소에 대한 수용체인 ANTR2(CMG2로도 공지됨)의 높은 수준을 특이적으로 발현하는 한편, 이 수용체가 다른 뉴런 아형에 의해 실질적으로 발현되지 않는다는 본 발명자들의 발견에 기초한다. 탄저병 독소에 고유한 엔도솜 전달 기전을 이용함으로써, 본 발명자들은 통각수용체로 문자 카고를 특이적으로 전달할 수 있고, 이것은 다른 신경학적 부작용을 야기하지 않으면서 통증 특이적 블록을 발생시킬 것이다. 예를 들어, 분

자 카고는 생체내 세포 신호전달 경로를 저해하거나 차단하거나, 시냅스 신경전달물질의 방출을 저해하거나 차단하는 세포내로 작용하는 독소일 수 있다.

[0011] 따라서, 본 발명자들은 일 양태에서 (a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx) 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공하고, 여기서 파트 (a) 및 (b)는 함께 연결되거나 융합된다. 용어 "융합 단백질"은 본 명세서에서 용어 "키메라 단백질" 및 용어 "조작된 융합 단백질"과 상호교환되어 사용된다.

[0012] 일 실시형태에서, BTx 또는 TTx는 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 펩타이드 또는 도메인을 포함한다.

[0013] 일 실시형태에서, BTx 모이어티 또는 전위 펩타이드/도메인은 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 어느 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된다. 백 슬래시 뒤의 알파벳(/A, /B, /C 등)은 클로스트리듐(*Clostridium*) 보툴리눔 패밀리 내의 다양한 혈청형을 나타낸다.

[0014] 일 실시형태에서, BTx 또는 TTx 효소 모이어티 또는 전위 펩타이드/도메인은 표 1에 제공된 BTx 또는 TTx 독소의 효소 모이어티 및 전위 도메인으로부터 선택된다.

[0015] 또 다른 양태에서, (a) 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있는 비세포독성 프로테아제; 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편(여기서, PA 또는 이의 PA 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 즉, 여기서 융합 단백질은 SNARE 단백질을 절단한다.

[0016] 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 클로스트리듐 신경독소 L 사슬을 포함한다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소는 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx)이다.

[0017] 일 실시형태에서, BTx는 BTx /A, BTx /B, BTx/C, BTx /D, BTx /E, BTx /F, BTx /G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0018] 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소 L 사슬은 표 1에 제공된 클로스트리듐 신경독소의 L 사슬로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소 L 사슬은 서열 번호 20-28로부터 선택된다.

[0019] 또 다른 양태에서, (a) 통각수용체 뉴런에서 이온 채널을 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(TM)(여기서, 통각수용체 뉴런은 내부에 이온 채널(예를 들어, 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다)을 발현함)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 즉, 여기서 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 통각수용체 뉴런에서 이온 채널을 차단하고, TM은 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합한다.

[0020] 또 다른 양태에서, (a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 PA 단편에 결합할 수 있는 단백질을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 즉, 여기서 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 채널의 유형 둘 다를 차단하고, 파트 (b)는 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 PA 단편에 결합하는 단백질이다.

[0021] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질에 의해 포함되는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 시스템 노트 모티프를 포함한다.

[0022] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질에 의해 포함되는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 델타 팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소이다.

[0023] 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)이다.

[0024] 일 실시형태에서, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 통각수용체 뉴런에서 발현된 ANTXR2(CMG2) 수용체에 결합한다.

[0025] 일 실시형태에서, TM은 (i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA); (ii) PA의 C 말단 수용체 결합 도메인; 및 (iii) 통각수용체 뉴런 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 일 실시형태에서, PA는 퓨린 절단에 저항성인 돌연변이체 PA이다.

- [0027] 일 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA63 또는 PAd4이다.
- [0028] 일 실시형태에서, ANTXR2에 결합하는, PAd4, PA 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 변형되거나 돌연변이된다.
- [0029] 일 실시형태에서, ANTXR2에 결합하는, PAd4, PA 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 프로테아제, 예컨대 Lys C에 의한 절단에 저항성이다.
- [0030] 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체이다.
- [0031] 일 실시형태에서, 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 신경 성장 인자(NGF) 수용체, ANTXR2 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합한다.
- [0032] 일 실시형태에서, 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된다.
- [0033] 일 실시형태에서, PA에 결합할 수 있는 단백질은 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 탄저병 독소 부종 인자(EF)이다. 즉, 여기서 단백질은 PA에 결합하고, LF 또는 EF이다.
- [0034] 일 실시형태에서, LF의 PA 결합 도메인은 (LFPABD 또는 LFn이라 축약된) LF의 N 말단 도메인이다.
- [0035] 일 실시형태에서, EF의 PA 결합 도메인은 (EFPABD 또는 EFn이라 축약된) EF의 N 말단 도메인이다.
- [0036] 또 다른 양태에서, (a) AB 독소; (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편(여기서, PA 또는 이의 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함); 및 (c) 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토졸로 독소(프로테아제)를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(translocation domain: TL)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 즉, TL은 통각수용체 뉴런의 시토졸로 독소를 전위시킨다.
- [0037] 일 실시형태에서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쇠가 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된다.
- [0038] 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)이다.
- [0039] 일 실시형태에서, PA 단편은 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인이다.
- [0040] 일 실시형태에서, TL은 클로스트리듐 신경독소로부터 유래한 전위 도메인이거나 홀로톡신이거나; AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형된 또는 돌연변이된 홀로톡신의 돌연변이체 형태이다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 탄저병 독소 보호성 항원(PA)의 C 말단 수용체 결합 도메인에 연결된, N 말단 효소 도메인(LC 또는 L 사슬) 및 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N)을 포함하는, 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티를 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인은 예를 들어 PAd4 도메인일 수 있다.
- [0042] 일 실시형태에서, 융합 단백질은 BTx 모이어티와 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인 또는 PAd4 도메인 사이에 링커 웹타이드를 추가로 포함한다.
- [0043] 또 다른 양태에서, (a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티의 보툴리눔 신경독소 N 말단 효소 도메인 및 (b) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질(여기서, 파트 (a)는 파트 (b)에 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결됨)이 본 명세서에 제공된다.
- [0044] BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트를 한정하는 아미노산 서열(여기서, BTx의 H_N은 BTx 모이어티의 C 말단 측에 위치함)을 추가로 포함할 수 있다. 벨트의 존재는 L 사슬을 안정화시킨다.
- [0045] BTx 모이어티가 BTx의 L 사슬 및 H_N 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진, BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, L 사슬과 H_N 도메인 사이의 S-S 브릿지는 환

원되지 않는다.

- [0046] BTx 모이어티가 BTx의 H_N 도메인 없이 L 사슬을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진, BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트 및 L 사슬에서의 Cys 잔기는 Ala, Ser 또는 Thr로 돌연변이될 수 있다.
- [0047] 일 실시형태에서, BTx L 모이어티 및 LFn 또는 EFn 도메인을 포함하는 융합 단백질에 대해, 융합 단백질은 BTx L 모이어티와 LFn 또는 EFn 도메인 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함한다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소에 연결된, 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4); 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 저해제 시스테인 노트 독소이다.
- [0049] 일 실시형태에서, 융합 단백질은 PA, PAd4 또는 통각수용체 결합 단백질과 다이설파이드 함유 웨타이드 독소(예를 들어, 저해제 시스테인 노트 독소)를 추가로 포함한다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태에 결합함)에 대한 하나 이상의 부위에서 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 작동 가능하게 연결된, 또는 화학적으로 가교결합된, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소를 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.
- [0051] 독소가 LFn 또는 EFn에 융합된 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 LFn과 독소 또는 EFn과 독소 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함한다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 연결된 링커 웨타이드에 융합된 AB 독소를 포함하는 융합 단백질로서, 융합 단백질은 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화시키도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.
- [0053] AB 독소를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트, 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트, 쉬가 독소 A 파트 및 B 파트, 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된다.
- [0054] 또 다른 양태에서, 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 연결된, 클로스트리듐 신경독소 또는 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소로부터의 전위/기공 형성 도메인과 함께 N 말단 효소 도메인(사슬 A)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 클로스트리듐 신경독소의 예는 (과학 문헌에서 자주 TTx 또는 TeNT라 측정된) 파상풍 신경독소이다.
- [0055] 일 실시형태에서, 융합 단백질은 TTx 모이어티와 PAd4 도메인 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함한다.
- [0056] 링커를 가지는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다.
- [0057] 링커를 가지는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정하다.
- [0058] 링커를 가지는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함한다.
- [0059] 링커를 가지는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는다.
- [0060] BTx 모이어티를 포함하는 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, BTx 모이어티는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G 중 어느 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된다. 예를 들어, BTx 경쇄 및 중쇄 도메인은 서열 번호 29-31 또는 본 명세서에 기재된 표 1로부터 선택된다. 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소가 또한 사용될 수 있다고 구체적으로 고려된다.
- [0061] PAd4 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 텐덤으로 2개 내

지 10개의 PAd4 도메인을 포함한다.

[0062] PAd4 도메인 및 BTx 모이어티를 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 PA의 N 말단 측으로부터의 약 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 BTx 모이어티와 PAd4 사이에 추가로 혼입된다.

[0063] PAd4 도메인 및 AB 독소를 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 PA의 N 말단 측으로부터의 약 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 AB 독소와 PAd4 사이에 추가로 혼입된다.

[0064] PAd4 도메인, 예를 들어 PAd4, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기의 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체되고, 여기서 넘버링은 서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀 후 서열 번호 1의 것에 관한 것이다.

[0065] PAd4 도메인, 예를 들어 PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기의 하나 이상은 예를 들어 Arg 또는 His에 의해 대체된다.

[0066] 전체 PA 단백질을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 아미노산 잔기 ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷을 포함하는 PA의 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체된다. 일 실시형태에서, 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)이다.

[0067] PAd4 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기의 하나 이상은 Asp에 의해 대체된다.

[0068] *

[0069] *본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함한다.

[0070] BTx L 사슬 및 H 사슬의 전부 또는 일부를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, BTx의 H 사슬과의 BTx의 L 사슬 연접부에 상응하는 잔기는 절단된다.

[0071] 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 NGF 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합한다. 일 실시형태에서, 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된다.

[0072] 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 융합 단백질 중 어느 하나를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함한다.

[0073] 기재된 임의의 조성물의 일 실시형태에서, 조성물은 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA)을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, PA는 올리고머 PA이다. 일 실시형태에서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질을 코딩하는 핵산이 본 명세서에 제공된다.

[0075] 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 벡터가 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드, 박테리아파지 또는 바이러스 벡터이다. 예를 들어, 플라스미드는 박테리아, 예를 들어 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)에서의 재조합 단백질 발현을 위한 발현 플라스미드이다. 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다.

[0076] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 또는 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 플라스미드를 보유하는 이. 콜라이(*E. coli*). 예를 들어, 핵산에서 코딩된 융합 단백질의 재조합 단백질 발현을 위한. 또 다른 양태에서,

이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 바이러스 입자를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다.

[0077] 또 다른 양태에서, 융합 단백질을 제조하는 방법으로서, 융합 단백질이 발현되는 조건 하에 본 명세서에 기재된 세포를 배양하는 단계, 및 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0078] 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 방법에 의해 제조된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.

[0079] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질, 또는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 융합 단백질은 글라이코실화된다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질, 또는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 융합 단백질은 비글라이코실화된다.

[0080] 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 원핵생물 세포, 예컨대 박테리아이다. 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 박테리아 세포이다. 일 실시형태에서, 박테리아는 에스체리치아 콜라이(이. 콜라이)이다. 또 다른 실시형태에서, 박테리아는 약독화된 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) 균주, 예를 들어 CDC 684이다. 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 효모 세포이다. 일 실시형태에서, 효모는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)이다.

[0081] 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 효모 세포는 글라이코실화 결핍된다.

[0082] 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 효모 세포는 글라이코실화되고, 프로테아제 결핍된다.

[0083] 융합 단백질을 제조하는 것에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 포유류 세포이다. 일 실시형태에서, 포유류 세포는 COS 세포, CHO 세포 또는 NSO 세포이다.

[0084] 일 실시형태에서, 통증의 치료를 위한 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질의 용도가 본 명세서에 제공된다.

[0085] 일 실시형태에서, 통증의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질의 용도가 본 명세서에 제공된다.

[0086] 또 다른 양태에서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소, 예를 들어 코노톡신(CTx)과 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.

[0087] 또 다른 양태에서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 클로스트리듐 신경독소의 L 사슬과 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 이 융합 단백질은 클로스트리듐 신경독소의 H 사슬의 벨트를 추가로 포함할 수 있고, 벨트는 H 사슬의 N 말단 분절이다. 또 다른 양태에서, 세포내로 작용하는 독소(예를 들어, AB 유형 독소)와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.

[0088] 또 다른 양태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. ANTXR2는 PA에 대한 네이티브 수용체이다. 즉, 분자는 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화한다.

[0089] 또 다른 양태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. ANTXR2는 PA에 대한 네이티브 수용체이다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, PA는 하나 이상의 수용체에 대한 결합을 증대시키도록 추가로 조작될 수 있다. 즉, 분자는 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화한다.

[0090] 일 실시형태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는

분자 또는 이를 특이적으로 표적화하는 분자는 NGF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 모방체, 또는 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 모방체로부터 선택된다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널을 특이적으로 표적화 할 수 있는 분자는 하나 이상의 수용체에 대한 결합을 증대시키도록 추가로 조작될 수 있다.

[0091] 일 실시형태에서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx), 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 탄저병 치사 독소(치사 인자, LF), 및/또는 탄저병 부종 독소(부종 인자, EF)로부터 선택된다.

[0092] 또 다른 양태에서, 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA)(여기서 mPA는 이의 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이됨), 및 특이적으로 탄저병 독소 부종 인자 (EF) 및/또는 탄저병 치사 인자(LF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.

[0093] 임의의 이전의 문단의 조작된 융합 단백질의 일 실시형태에서, PA 또는 mPA는 공유 또는 비공유 올리고머 형태이다. 일 실시형태에서, 올리고머 형태는 예를 들어 공유로 또는 비공유로 분자에 결합된다.

[0094] 또 다른 양태에서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소, 예를 들어 코노톡신(CTx)과 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0095] *

[0096] *또 다른 양태에서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0097] 또 다른 양태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널을 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 조작된 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0098] 또 다른 양태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. ANTXR2는 PA에 대한 네이티브 수용체이다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, PA는 하나 이상의 수용체에 대한 결합을 증대시키도록 추가로 조작될 수 있다.

[0099] 일 실시형태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널을 특이적으로 표적화할 수 있는 분자는 NGF, 및 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체로부터 선택된다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널을 특이적으로 표적화할 수 있는 분자는 하나 이상의 수용체에 대한 결합을 증대시키도록 추가로 조작될 수 있다.

[0100] 또 다른 실시형태에서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 탄저병 치사 독소(치사 인자, LF), 및/또는 탄저병 부종 독소(부종 인자, EF)로부터 선택된다.

[0101] 또 다른 양태에서, 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA)(여기서 mPA는 이의 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이됨), 및 특이적으로 탄저병 독소 부종 인자 (EF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0102] 일 실시형태에서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태이다. 일 실시형태에서, 올리고머 형태는 분자에 결합된다.

[0103] 일 실시형태에서, 융합 단백질을 포함하는 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0104] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 포함하는 조성물을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

- [0105] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.
- [0106] *
- [0107] *또 다른 양태에서, 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증을 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 포함하는 조성물을 이를 요하는 대상체에게 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사에 의해 말초로 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.
- [0108] 또 다른 양태에서, 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애를 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 포함하는 조성물을 이를 요하는 대상체의 중추 신경계로 경막외 주사, 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재된다.
- [0109] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(PAd4)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 여기서 조작된 융합 단백질은 통각수용체 뉴런으로 전달되고, 통각수용체 뉴런에서의 세포내 신호전달 사건의 감소 또는 통각수용체 뉴런으로부터 방출된 신경전달물질의 감소를 발생시킨다.
- [0110] 일 실시형태에서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 탄저병 치사 독소(치사 인자), 및/또는 탄저병 부종 독소(부종 인자)로부터 선택된다.
- [0111] 몇몇 양태에서, 이전의 문단에서의 기재된 임의의 조성물 또는 이전의 문단에 기재된 융합 단백질을 포함하는 임의의 조성물은 통증의 치료를 위한 용도이다. 통증의 치료는 이전의 문단에 기재된 상이한 조성물의 1회 초과, 즉 수회 투여를 포함할 수 있다.
- [0112] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재된다.
- [0113] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 치사 인자(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 대안적으로, 통증의 치료는 클로스트리듐 신경독소의 L 사슬과 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 세포내로 작용하는 독소(예를 들어, AB 유형 독소)와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행된다. 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소의 L 사슬을 포함하는 융합 단백질은 클로스트리듐 신경독소의 H 사슬의 벨트를 추가로 포함할 수 있고, 벨트는 H 사슬의 N 말단 분절이다.
- [0114] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법으로서, 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 조작된 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재된다.
- [0115] 일 실시형태에서, 분자는 NGF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 및 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체로부터 선택된다.
- [0116] 또 다른 실시형태에서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx), 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 탄저병 치사 독소(치사 인자), 및/또는 탄저병 부종 독소(부종 인자)로부터 선택된다.
- [0117] 또 다른 양태에서, 통증의 치료를 요하는 대상체에서 통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA)(여기서 mPA는 이의 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 (예를 들어, 화학적으로)

변형되거나 돌연변이됨), 및 특이적으로 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 치사 인자(LF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는 조작된 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 기재된다.

[0118] 일 실시형태에서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태로 투여되고, 여기서 올리고머 PA 또는 mPA는 수용체 보유 세포에 대한 증가한 결합도(avidity)를 달성하도록 단백질분해로 활성화된 PA 또는 mPA(또는 이의 돌연변이체)로부터 형성된다. 일 실시형태에서, 올리고머 형태는 투여 전에 분자에 결합된다.

[0119] 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제 내에 탄저병 보호성 항원(PA)을 포함하는 조성물을 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 투여한 후에 별개로 투여된다.

[0120] 일 실시형태에서, 투여는 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 또는 중추 신경계로의 경막외 주사에 의해, 또는 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사를 사용한 말초 투여에 의해 수행된다.

[0121] 또 다른 실시형태에서, 통증은 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통, 다른 전신 통증 장애, 신경, 관절, 피부, 내장, 방광, 및 근육 통증으로부터 선택된다.

[0122] 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 융합 단백질 중 하나 이상 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0123] 또 다른 양태에서, 통증의 치료를 위한 약제의 제조에서의 용도를 위한 이전의 문단에 기재된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 제제화된다.

[0124] 또 다른 양태에서, 통증의 치료에서의 용도를 위한 이전의 문단에 기재된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 제제화된다.

도면의 간단한 설명

[0125] 도 1a-1b는 탄저병 독소 수용체가 다른 신경계 조직과 비교하여 배근 신경절에서 특이적으로 발현된다는 것을 입증한다. (도 1a) Antxr2 전사체 발현이 통각수용체 뉴런이 발견되는 배근 신경절 조직에 오직 존재한다는 것을 보여주는 11개의 신경 조직 유형의 발현 프로파일링 데이터. (도 1b) 둘러싼 조직 또는 척수가 아니라 배근 신경절에서의 강한 발현을 보여주는 Antxr2에 대한 인시츄 혼성화 이미지.

도 2는 Antxr2가 자기수용기 감각 뉴런과 비교하여 통각수용체 뉴런에서 매우 농후화된다는 것을 입증한다(큰 점 및 화살표). 화산 도표(차이의 배수 변화에 대한 P 값)는 Antxr2가 자기수용기 뉴런과 비교하여 통각수용체 통증 감지 뉴런에서 강하게 농후화된다는 것을 보여준다.

도 3은 보호성 항원(PA) 단독이 뉴런에서의 단백질 합성을 저해하지 않는다는 것을 보여준다.

도 4는 PA 단독이 뉴런에서의 단백질 합성을 저해하지 않는다는 것을 보여준다.

도 5는 융합 단백질 LFn-DTX에 의한 뉴런에서의 단백질 합성 저해가 PA의 존재에 의존적이고, LFn-DTX가 피코몰 농도로 통각수용체 뉴런에서 세포내로 단백질 합성을 차단할 수 있다는 것을 보여준다.

도 6은 PA 및 융합 단백질 LFn-DTX가 뉴런에서의 단백질 합성을 저해한다는 것을 보여준다.

도 7a는 BoTX 단백질 및 상이한 PA 유래 단백질의 다양한 도메인을 사용한 BoTX-PA 융합 단백질의 실시형태의 모듈 구성을 보여준다. PA 유래 단백질은 프로테아제, 예컨대 퓨린 프로테아제에 의한 절단에 저항성인 Pad4 도메인 또는 PA이다.

도 7b는 TTX 단백질 및 상이한 PA 유래 단백질의 다양한 도메인을 사용한 TTX-PA 융합 단백질의 실시형태의 모듈 구성을 보여준다. PA 유래 단백질은 프로테아제, 예컨대 퓨린 프로테아제에 의한 절단에 저항성인 Pad4 도메인 또는 PA이다.

도 8a는 BoTX 및 PA 결합 도메인 LFn 또는 EFn을 포함하는 융합 단백질의 실시형태의 모듈 구성을 보여준다. 융합 단백질은 LF 및 EF인 2개의 PA 결합 단백질의 PA 결합 도메인과 함께 다양한 BoTX 혈청형으로부터 경쇄/촉매 도메인을 사용하여 만들어진다. 이 BoTX-PA 결합 융합 단백질은 통증의 치료를 위해 네이티브 PA 단백질과 함께 사용될 것이다.

도 8b는 TTX 또는 다른 세포내 작용하는 독소 및 LFn 또는 EFn인 PA 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질의 실시형태의 모듈 구성을 보여준다. 이 융합 단백질은 LF 및 EF인 2개의 PA 결합 단백질의 PA 결합 도메인과 함께 TTX 단백질 또는 다양한 다른 세포내 작용하는 독소의 경쇄/촉매 도메인을 사용하여 만들어진다.

도 9는 독소 또는 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소 및 PA 유래 단백질을 함유하는 작은 다이설파이드를 포함하는 융합 단백질의 실시형태의 모듈 구성을 보여준다. PA 유래 단백질은 프로테아제, 예컨대 퓨린 프로테아제에 의한 절단에 저항성인 Pad4 도메인 또는 PA이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0126]

약어: ANTXR2(CMG2) = 탄저병 독소에 대해 세포 표면 수용체; PA = 탄저병 독소 보호성 항원, 83kDa; PA63 = 퓨린 절단으로부터 유래한 PA의 단편의 활성 63kDa, 고리 형상 헵타미 또는 옥타미로 자가 조립하여 수용체 결합된 프리포어(preporer)를 형성함, PA63 프리포어는 3개 또는 4개까지의 EF, LF, LFn 또는 EFn에 결합하여, 복합체를 형성하고, 이것은 이후 내포작용됨; PAd1 = PA의 LF/EF 결합 성분 또는 단편; PAd2 = PA의 막 전위 성분 또는 단편, 탄저병 유래 전위 도메인 또는 웨타이드; PAd3 = PA의 올리고머화 성분 또는 단편; PAd4 = PA의 네이티브 수용체인 ANTXR1 및 ANTXR2 수용체에 대한 PA의 숙주 세포 수용체 결합 도메인; PA^{퓨린-} = 변형된 또는 돌연변이된 퓨린-프로테아제 인식 부위를 가지는 퓨린 내성 PA는 다합체화 및 전위할 수 없고, LFn 또는 EFn에 결합하지 않지만, 여전히 숙주 세포 수용체에 결합할 수 있음; ICK = 저해제 시스테인 노트; LFn = 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 PA 결합 도메인, "탄저병 독소 전위 웨타이드"; EFn = 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 PA 결합 도메인, 또한 "탄저병 전위 신호 웨타이드"; LF = 탄저병 치사 독소(치사 인자); EF = 탄저병 부종 독소(부종 인자); mPA = 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 보호성 항원 모이어티; Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9 = 이온 채널 단백질; DTX = 독소의 A 및 B 성분을 포함하는 디프테리아 독소, DTA = 디프테리아 독소 오직 독소의 A 성분, 효소 성분, 세포내 작용하는 독소인 성분; PE 또는 PTx = 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A; BTx 또는 BoTX 또는 BoNT = 보툴리눔 독소; TTx = 파상풍 독소; CTx = 코노톡신; CNT = 클로스트리듐 신경독소 패밀리; LC 또는 L = 클로스트리듐 신경독소 패밀리의 신경독소 구성원의 50kDa 경쇄, L은 아연 의존적 엔도펩티다제로서 작용함; HC = 중쇄(HC = H_N + H_C)는 각각 약 50kDa인 2개의 기능적 도메인을 함유함; H_N = HC의 N 말단 절반은 클로스트리듐 신경독소 패밀리의 신경독소 구성원의 전위 도메인임. H_N은 지질 이층에서 이온 채널을 형성하는 것으로 공지됨. H_C = HC의 C 말단 절반은 클로스트리듐 신경독소 패밀리의 신경독소 구성원의 수용체 결합 도메인임; LH_N = L + H_N.

[0127]

본 명세서에 달리 정의되지 않은 한, 본원과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 본 개시내용이 속하는 당해 분야의 숙련자에 의해 흔히 이해되는 의미를 가져야 한다. 본 발명이 본 명세서에 기재된 특정한 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않고 그래서 변할 수 있다고 이해되어야 한다. 본 명세서에 사용된 전문용어는 오직 특정한 실시형태를 기술할 목적을 위한 것이고, 청구항에 의해 오직 한정되는 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다. 분자 생물학에서의 공통 용어의 정의는 문헌[The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); and Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA(2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA(2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; 및 Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)](이들의 내용은 모두 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함

됨)에서 발견될 수 있다.

[0128] 본원에 걸쳐 인용된 문헌 참조, 등록 특허, 공개 특허 출원 및 계류 중인 특허 출원을 포함하는 모든 특허 및 다른 공보는, 예를 들어 본 명세서에 기재된 기법과 연결되어 사용되는 이러한 공보에 기재된 방법론을 기재하고 개시할 목적을 위해 본 명세서에 참고로 명확히 포함된다. 이들 공보는 본원의 출원일 전에 이들 개시내용에 대해 오직 제공된다. 이와 관련하여 어떤 것도 본 발명자들이 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 이러한 개시내용에 앞선다고 자격 부여되지 않는다는 인정으로 해석되지 않아야 한다. 날짜에 관한 모든 성명 또는 이들 문헌의 내용에 관한 표시는 출원인에게 이용 가능한 정보에 기초하고, 이들 문헌의 날짜 또는 내용의 정확성에 관한 어떠한 시인을 구성하지 않는다.

[0129] 본 개시내용의 실시형태의 설명은 철저하고 개시된 정확한 형태로 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 개시내용의 구체적인 실시형태 및 본 개시내용에 대한 예는 예시적인 목적을 위해 본 명세서에 기재되어 있지만, 다양한 균등한 변형은 당해 분야의 숙련자가 인식하는 것처럼 본 개시내용의 범위 내에 가능하다. 예를 들어, 방법 단계 또는 기능이 소정의 순서로 제시되어 있지만, 대안적인 실시형태는 상이한 순서로 기능을 수행할 수 있거나, 기능은 실질적으로 동시에 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 개시내용의 교시는 적절한 바대로 다른 절차 또는 방법에 적용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 다양한 실시형태는 조합되어 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 개시내용의 양태는 필요한 경우 변형되어 상기 문헌 및 출원의 조성물, 기능 및 개념을 이용하여 본 개시내용의 다른 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 더구나, 생물학적 기능 균등성 고려로 인해, 종류 또는 양에서 생물학적 또는 화학적 작용에 영향을 미치지 않으면서 단백질 구조에 약간의 변경이 이루어질 수 있다. 이들 및 다른 변경은 상세한 설명의 견지에서 본 개시내용에 이루어질 수 있다. 모든 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0130] 본 발명자들은 통증을 가라앉히는 분자의 통증 감지 통각수용체 특이적 전달을 이용하여 통증을 치료하기 위한 신규한 신규한 방식을 확인하였다.

[0131] 탄저병의 원인 물질인 바실러스 안트라시스에 의해 생긴 피부 병변은 특징상 무통증이다. 본 발명자들은 통증 감지 통각수용체 뉴런이 탄저병 독소에 대한 수용체인 ANTXR2의 높은 수준을 특이적으로 발현하지만, 이 수용체가 다른 뉴런 아형에 의해 발현되지 않거나 실질적으로 발현되지 않는다는 것을 발견하였다. 탄저병 독소 수용체는 또한 관절 개형에 관여한 조혈 계통 세포(마크로파지, 파글세포, 조골세포)에 의해 발현된다. 이론에 구속 되고자 바라지 않으면서, 본 발명자들은 탄저병 독소가 통각수용체 감각 뉴런 상의 ANTXR2를 통해 작용함으로써 감염 동안 통증을 침묵시키고, 이것이 관절 개형에 관여한 면역 세포를 표적화하기 위해 또한 사용될 수 있다는 것을 제안하였다.

[0132] 본 발명자들은, 네이티브 표적 수용체에 결합하는 탄저병 수용체가 제거된 시스템(미국 특허 출원 공보 제 20150044210호)을 포함하는, 상이한 탄저병 독소 기반 전달 시스템을 사용하여 항원(미국 특허 출원 공보 제 20030202989호) 및 단백질(WO 제2012096926호)의 표적화된 전달의 시스템을 이전에 기재하였다. 이들 시스템에서, 세포로 시약의 진입을 허용하도록 탄저병 독소의 기공 형성 능력을 이용하였다. 사용자가 원하는 바대로 세포 결합 특이성의 조작을 허용하도록 탄저병 독소의 수용체 결합 부분을 제거하였다.

[0133] 요컨대, 보호성 항원(PA)이라 칭하는 탄저병 독소의 수용체 결합 성분은 ANTXR2에 결합하고, 내포작용되고, 후속하여 엔도솜 막을 통해 시토졸로 탄저병 치사 인자(LF) 또는 탄저병 부종 인자(EF), 또는 둘 다를 전위시킨다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 주요 탄저병 독소 수용체 ANTXR2가 모든 신경 조직 중에서 통각수용 뉴런 내에 발현에서 매우 특이적이라는, 즉 탄저병 독소가 ANTXR2에 대한 결합을 통해 통각수용 뉴런에 우선적으로 표적화된다는 놀라운 발견을 만들었다. 네이티브 탄저병 독소의 이 우선적 결합의 발견은 매우 특이적이고 효과적인 통증 봉쇄를 생성하도록 통각수용 뉴런을 특이적으로 표적화하도록 탄저병 독소 및 이의 시토졸 전달 기전의 사용을 허용한다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, 표적 뉴런이 탄저병 시스템이 자연에서 결합하는 수용체를 발현하면서, 수용체 결합 변형이 필요하지 않다. 임의의 실시형태의 몇몇 양태에서, 탄저병 독소-ANTXR2 상호작용과 협력하여 추가 리간드-수용체 상호작용의 사용에 의해 특이성은 증가하고 부작용은 감소할 수 있다. 여기서 본 발명자들은 만성 통증을 특이적으로 차단하고, 근육 경직을 침묵화시키고, 골관절염에서 통증 및 관절 파괴 둘 다를 표적화하고 예방하기 위한 플랫폼으로서 탄저병 독소를 사용하였다. 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은, 임의의 네이티브 탄저병 독소 결합 활성과 독립적인 수단에 의해 표적화된 세포로의 시약의 진입을 허용하도록 독소의 기공 형성 활성을 오직 사용하는 것 대신에, 특정한 세포형으로의 직접 전달에 탄저병 독소의 수용체 결합 부분을 사용하는 데 있어서 초기의 탄저병-독소 전달 시스템으로부터 나뉜다.

- [0134] 만성 통증은 몇몇 표적화된 치료가 이용 가능한 사회에서 주요한 사회 경제적 부담이다. 통각수용체 감각 뉴런은 통증 감각 및 회피 행동을 발생시키는 유독한/해를 주는 자극의 검출을 매개한다. 염증 동안의 또는 신경 손상 후의 통각수용체의 지속적인 활성화는 만성 통증을 야기한다. 본 발명자들은 통증을 치료하기 위한 새로운 표적화된 분자 집합체를 치료하기 위한 단백질성 독소의 사용을 제공한다.
- [0135] 본 발명자들은 탄저병 독소 수용체 ANTRX2가 다른 뉴런 아형과 비교하여 통각수용체에서 고도로 발현되고 이들 뉴런에 특이적이라는 것을 발견하였다. 이 발견은 본 발명자들이 통각수용체를 사멸하거나 그렇지 않으면 중추 신경계(CNS)에 신호를 전송하는 이들의 능력을 차단하도록 작제물을 생성하기 위한 세포 특이성 결정부위로서 탄저병 독소의 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(PAd4)을 사용할 수 있다는 것을 제안한다.
- [0136] 이 놀라운 전략의 이점은 대개 다른 뉴런 아형에 오프 타깃 효과를 가지는 다른 통증 치료와 비교하여 말초 통증 감지 뉴런을 표적화하는 것의 특이성이다.
- [0137] 본 발명자들은 표적화된 통증 킬러로서 사용하기 위한 세포내로 작용하는 독소. 예컨대 탄저병 독소, 다이설파이드 함유 펩타이드 독소, 예컨대 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소, AB 유형 독소, 예컨대 디프테리아 독소(DT), 및 SNARE 표적화 독소, 예컨대 파상풍 독소(TTx), 및/또는 보툴리눔 독소(BTx)를 조작하는 것을 기재한다. 몇몇 실시형태에서, 이들 독소는 통각수용체 뉴런으로의 이들 독소의 세포내 효소 활성의 PA 매개된 전달에 의존한다.
- [0138] 조작된 융합 (키메라) 단백질의 모듈 구성에 유용한 독소 및 이의 성분, 파트 및 단편
- [0139] 탄저병 독소
- [0140] 탄저병 독소는 바실러스 안트라시스인 박테리아의 독성 균주에 의해 분비된 3개의 단백질 성분의 삼합체 복합체이다. 3개의 단백질 성분은 보호성 항원(PA), 부종 인자(EF) 및 치사 인자(LF)이다. PA는 특이적 수용체 표적화 및 결합을 매개하는 83kDa 단백질이다. 종양 내피세포 마커-8(TEM8 또는 "ANTRX1") 또는 모세관 형태발생 단백질 2(CMG2 또는 "ANTXR2")인 이의 수용체에 결합 시, PA83은 퓨린 또는 다른 퓨린 유사 프로테아제에 의해 단백질분해로 활성화되어서, N 말단 조각(PA20)이 제거되고 수용체에 결합된 남은 조각(PA63)이 남는다. 이것은 4개 까지의 EF/LF 분자에 결합하는 헵타머/옥타머를 형성하도록 PA가 다합체화하는 것을 가능하게 하는 것을 활성화 한다. PA63은 저절로 올리고머화하여 고리 형상 헵타머 또는 옥타머 "프리포어"를 형성하고, 이것은 높은 nM 친화도로 LF 또는 EF에 결합할 수 있는 결합 부위를 함유한다. LF 및 EF(각각 약 90kDa)는 프리포어에 결합하는 상동성인 약 260개의 잔기 N 말단 도메인을 가지고; LF 및 EF의 효소 모이어티는 C 말단이다. 생성된 복합체는 내포작용에 의해 내재화되고, 엔도솜의 낮은 pH 하에, PA63 프리포어는 배좌를 변경하고, 막으로 삽입하고, 결합된 카고 분자(LF/EF)를 시토졸로 수송하고, 여기서 이들은 쟤풀딩하고 이들의 각각의 반응을 촉매화한다. LF는 소정의 미토겐 활성화된 단백질 키나제 키나제(MAP 키나제/ERK 키나제; MAP 키나제 키나제로도 공지됨)의 가수분해(절단)를 촉매화하는 아연 독립적 엔도펩티다제이고, 이것은 많은 세포 신호전달 경로를 붕괴시키고, 이는 결국 세포사를 야기한다. EF는 세포에서 cAMP를 대단한 수준으로 증가시키는 칼모듈린 및 칼슘 의존적 아데닐레이트 시클라아제이다. 세포내 cAMP의 변화는 막 투과성에 영향을 미치고 부종을 설명할 수 있다. 마크로파지 및 호중구에서, 추가 효과는 포식 과정에 필요한 ATP 리저브의 고갈이다. 이것은 탄저병 독소에 의해 일어날 수 있는 가능한 조합의 목록이다: PA+LF는 치사 활성을 야기하고; EF+PA는 부종을 야기하고; EF+LF는 세포에 독성 효과를 가지지 않고; PA+LF+EF는 이환된 세포에서 치사 활성 및 부종을 야기한다. LF는 N 말단 PA 결합 도메인(본 명세서에서 "LFPABD" 또는 "LFn"이라 측약) 및 C 말단 단백질분해 성분으로 이루어진다. LF는 미토겐-활성화된 단백질(MAP) 키나제 키나제를 절단함으로써 작용한다. EF는 N 말단 PA 결합 도메인(본 명세서에서 "EFPABD" 또는 "EFn"이라 측약), 중앙 효소 성분 및 C 말단 칼모듈린 결합 성분으로 이루어진다. EF는 세포 cAMP 수준을 상승시키는 칼슘 의존적 아데닐레이트 시클라아제이다. MAP 키나제 및 cAMP 신호전달은 둘 다 통각수용체 신호전달을 매개하는 데 있어서 중요한 것으로 발견되었다.
- [0141] PA는 LF/EF 결합 성분(PAd1), 막 전위 성분(PAd2), 올리고머화 성분(PAd3) 및 숙주 세포 수용체 결합 성분(PAd4)인 4개의 구조적으로 구별되는 도메인에 걸쳐 분포된 4개의 주요 기능을 보유한다.
- [0142] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "탄저병 독소 보호성 항원" 또는 "PA"는, 올리고머 형태로, ANTRX2 수용체에 특이적으로 및 선택적으로 결합하여, 후속하여 세포막에서 기공을 형성하고 카고 독소를 이행시키는 폴리펩타이드를 의미한다. PA의 서열, 예를 들어 (NCBI 유전자 번호: 3361714(서열 번호 1; 29 아미노산 잔기 펩타이드 서열은 신호 펩타이드임: N 말단에서의 MKKRKVLIPALMALSTILVSSTGNLEVIQA(서열 번호 34)(NCBI 기준 서열: NP_052806;

UNIPROT P13423)는 당해 분야에 공지되어 있다. 아미노산 잔기의 넘버링은 신호 펩타이드를 가지는 서열 번호 1에 참조될 수 있다. 대안적으로, 아미노산 잔기의 넘버링은 신호 펩타이드가 없는 PA 서열에 참조될 수 있다. PA는 숙주 세포 표면 ANTRX2 수용체에 결합하고, 퓨린-페밀리 프로테아제에 의해 활성 63kDa PA 형태(PA63)로 절단되고, 이것은 고리 형상 헵타미 또는 옥타미로 자가 조립하여 수용체 결합된 프리포어를 형성한다. PA63 프리포어는 예를 들어 탄저병 치사 인자의 3개 또는 4개까지의 분자에 결합하여, 복합체를 형성하고, 이것은 이후 내포작용된다. 엔도솜의 산성화시, 보호성 항원 프리포어는 배좌 재배열을 겪어 막에 결친 이온 전도성 기공을 형성하고, 이것은 엔도솜으로부터 시토솔로 탄저병 치사 인자 및/또는 탄저병 부종 인자를 수송한다. 탄저병 치사 인자의 N 말단 도메인인 LFn은 기공에 대한 나노몰 결합 친화도를 가지고, 이 도메인(또는 상응하는 EF 도메인, EFn) 단독은 화학적 모이어티의 전위에 사용될 수 있다.

¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷에서의 퓨린-페밀리 프로테아제 절단 부위, 및 절단은 ¹⁶⁷RS¹⁶⁸ 사이에 발생하고, 아미노산 잔기 넘버링은 29개의 아미노산 신호 웨타이드 마이너스 서열 번호 1에 대해 참조된다. 퓨린 내성 PA를 만들기 위해 퓨린 부위를 제거하기 위해, RKKR(서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드 마이너스 서열 번호 1의 164-167번 잔기)은 (모든 염기성 잔기를 제거하기 위해) SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)에 의해 대체될 수 있다. 퓨린 내성 PA(PA^{퓨린})를 생성하기 위한 퓨린 절단 부위의 제거는 다합체화 및 전위를 방지할 것이다.

본 명세서에 사용된 바와 같은, "탄저병 독소 부종 인자" 또는 "EF"는 세포 내의 cAMP의 수준을 상승시키는 칼모듈린- 및 Ca^{2+} 의존적 아데닐릴 시클라아제를 의미한다. EF의 서열, 예를 들어 NCBI 유전자 번호: 3361726; 서열 번호 6이 공지되어 있다.

본 명세서에 사용된 바와 같은, "탄저병 독소 치사 인자" 또는 "LF"는 MAP 키나제 패밀리의 대부분의 MAP 키나제 패밀리를 절단시키는 금속단백질분해효소를 의미한다. LF의 서열, 예를 들어 NCBI 유전자 번호: 3361711; 서열 번호 7이 공지되어 있다. EF 및 LF의 추가의 토의를 위해, 예를 들어 문헌[Leppla, 79 PNAS, 3162 (1982); Duesbery et al., 280 Science 734 (1998); Vitale et al., 248 Biochem. Biophys. Res. Commun. 706 (1998)](이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다.

본 명세서에 사용된 바와 같은, "탄저병 전위 신호 웹타이드" 또는 "탄저병 독소 전위 웹타이드"는, 폴리웹타이드에 의해 포함되고/되거나 이에 연결될 때, 그 폴리웹타이드가 PA 또는 mPA(임의로 올리고며 복합체에서의 PA 또는 mPA)에 결합하고, 표적 세포의 세포질로 성숙 PA/mPA 기공에 의해 전위되게 하는, 탄저병 유래 도메인 또는 웹타이드를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 탄저병 독소 전위 웹타이드는 LFn(예를 들어, 서열 번호 7의 34-267번, 34-293번 또는 34-297번 아미노산, 이의 N 말단 신호 웹타이드를 가지는 전장 LF), EFn(예를 들어, 서열 번호 6의 59-277번 또는 34-290번 아미노산), 또는 이의 변이체일 수 있다.

본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, LFn 또는 EFn을 모방하는 작은 양으로 하전된 웹타이드 분절은 PA 또는 mPA 기공을 통해 카고 분자를 이행하는 것을 보조하도록 사용될 수 있다. 이 모방체는 적어도 하나의 비천연 아미노산으로 이루어질 수 있고, 예를 들어 국제 특허 공보 WO 제2012/096926호; 미국 특허 제9079952호 및 미국 특허 출원 공보 US 제2013/0336974호 및 US 제2015/0267186호(이들은 각각 그 전문이 참고로 본 명세서에서 포함됨)에 더 자세히 기재되어 있다.

본 명세서에 사용된 바와 같은, "PAd4" 또는 "보호성 항원 도메인 4"는 숙주 세포 세포 수용체(예를 들어, ANTXR1 및/또는 ANTXR2)를 인식하고 이에 결합하는 PA의 도메인을 의미한다. PAd4는 서열 번호 1의 약 621번 아미노산 내지 약 764번 아미노산의 서열(신호 펩타이드를 포함하는 PAd4 서열)을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, PAd4는 서열 번호 1의 621-764번 아미노산을 포함할 수 있고, 이것은 신호 펩타이드를 가지는 PA의 아미노산 서열이다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, PAd4는 서열 번호 1의 596-735번 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, PAd4는 서열 번호 1의 625-764번 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 또 다른 실시형태에서, PAd4는 서열 번호 1의 616-764번 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 또 다른 실시형태에서, PAd4는 서열 번호 1의 609-764번 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, PAd4는

RFHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKPLYISNPNYKVN
NVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 35)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실
시형태에서. PAd4는 본질적 으로

RFHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDLPLYISNPNYKV
NVAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 36)로 이루어진다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일

실시형태에서,

PAd4는

FHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 37)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시
형태에서,

PAd4는

본질적으로

FHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 38)로 이루어진다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실
시형태에서,

PAd4는

GLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 39)를
포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, PAd4는 본질적으로
GLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 40)로
이루어진다.

[0149]

본 명세서에 기재된 융합 단백질의 모든 양태의 일 실시형태에서, PAd4는 링커 웹타이드에 의해 다른 단백질 또는
독소에 융합되거나 연결된다. 링커 웹타이드의 예는
FHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 41), VEIEDTE(서열 번호 42),
KDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 43), STEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 44) 및
VGADESvvKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 45)를 포함한다.

[0150]

PAd4의 N 말단에 부착된 링커 웹타이드의 예는 링커 웹타이드 서열이 볼드체로 보일 때 하기와 같이 나타난다:

[0151]

FHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 46)

[0152]

VEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 47)

[0153]

KDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 48)

[0154]

STEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 49)

[0155]

VGADESvvKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKYNDKLPLYISNPNYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG(서열 번호 50)

[0156]

SNARE 표적화 독소(BTx 및 TTx 포함)

[0157]

보툴리눔 신경독소(BTx, 또한 BoTX 또는 BoNT라 측약)는 신경근 접합부에서의 아세틸콜린 방출의 저해의 결과로
서 하행 이완성 마비를 특징으로 하는 보툴리눔중독증을 야기한다. 클로스트리듐 속의 박테리아에 의해 생성된
7개의 보툴리눔 신경독소 혈청형(A-G)이 있다. 또한, 비클로스트리듐 종 웨이셀라 오리자에(*Weissella oryzae*)
SG25T로부터의 보툴리눔 유사 신경독소가 최근에 발견되었다(Nature Scientific Repo. Rts | 6:30257 | DOI:
10.1038/srep30257). 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)에 의해 생성된 과상풍 신경독소(TTx)와 함께
BTx는 클로스트리듐 신경독소(CNT) 패밀리를 구성한다. TTx는 BTx, 특히 BTx/B에 높은 정도의 서열 및 구조적
상동성을 나타내고, 경련성 마비를 특징으로 하는 과상풍의 원인 물질이다. 임상 표출에서 다르지만, 신경전달
의 저해인 기본적인 작용 방식은 모든 CNT에 흔하다. CNT에 의해 방출된 신경전달물질의 저해는 SNARE 단백질
(가용성 NSF 부착 단백질 수용체)인 외포작용 과정에 통합적인 단백질의 그룹의 특정한 절단에 의해 생긴다.
SNARE 단백질 중 하나 이상의 절단은 세포외 환경으로의 소포성 내용물의 방출에서 차단을 발생시킨다.

[0158]

이 SNARE 표적화 독소는 유사한 기본적 CNT 구조를 공유한다. CNT는 약 150kDa의 단쇄 폴리펩타이드로서 합성되
고(홀로톡신), 단일 다이설파이드 결합에 의해 연결된 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)로 이루어진 이사를 분자를 형성하
도록 후속하여 절단된다. 50kDa LC는 아연 의존적 엔도펩티다제로서 작용한다. 중쇄는 각각 50kDa의 2개의 기능
적 도메인을 함유한다. N 말단 절반(H_N)은 지질 이층에서 이온 채널을 형성하는 것으로 공지된 전위 도메인이고,
C 말단 절반(H_C)은 표적 세포막에 대한 결합 및 콜린성 뉴런으로의 독소 분자의 내재화에서 중요한 역할을 가지
는 강글리오사이드 및 단백질 결합 도메인이다. 3개의 기능적 도메인은 구조적으로 구별되고 선형 방식으로 배
열되어서, LC 도메인과 HC 도메인 사이에 접촉이 없다. 전반적으로, BTxs 및 TTx는 약 35%의 서열 동일성을 공
유한다. BTx 촉매 LC 도메인은 36% 이하의 서열 동일성을 공유하고[2], BTx/B 및 TTx의 LC 도메인은 50% 초과의

동일성을 가진다. (검토["Botulinum and tetanus neurotoxins:structure, function and therapeutic utility" by K. Turton et al., Trends in Biochemistry, 2002, 27:552-558]를 참조한다). 이사슬 독소를 형성하도록 훌로톡신을 절단하기에 적합한 프로테아제는 라이실 펩티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0159] 박테리아 클로스트리듐 보툴리눔에 의해 생성된 신경독성 단백질인 BTx는 50kDa 단백질분해 N 말단 끝(LC), 중간에 위치한 50kDa 전위 도메인(H_N) 및 50kDa 숙주 세포 수용체 결합 C 말단 끝(H_C)인 3개의 구별되는 도메인을 가지는 큰 단일 폴리펩타이드 분자로서 발현된다. 독소가 기능성이도록, 이것은 단일 다이설파이드 결합에 의해 함께 유지되는 경쇄(LC) 및 중쇄($HC = H_N + H_C$)로 이루어진 이사슬 단백질을 생성하도록 처음에 단백질분해로 절단되어야 한다. 단백질분해 활성화는 중요한데, 왜냐하면 수용체 결합 및 내포작용에 의한 내재화 후, 엔도솜의 후속하는 산성화가 단백질에서 등각 변화를 발생시켜서, 엔도솜 막으로의 H_N 도메인의 삽입, 전위 기공의 형성 및 세포질로의 LC의 전달(여기서, 다이설파이드 결합은 환원되고 LC는 방출됨)을 발생시킨다고 믿어지기 때문이다. LC는 고도로 특이적인 기질 특이성을 가지는 아연 의존적 프로테아제이다. 다수의 BTx 혈청형(A 내지 G) 및 하위혈청형(임의의 소정의 혈청형에 대해 12개 이하)이 존재한다. 혈청형은 보툴리눔 신경독소를 중화시키는 중화 항체의 능력에 기초한다. 현재까지 A 내지 G(BTx/A 내지 BTx/G)로 표기된 보툴리눔 신경독소의 7개의 혈청형이 확인되었다. 혈청형 내에 이것이 확인된 차세대 서열분석의 출현에 의해, BoNT의 아형이 존재하고, 이것은 단백질 수준에서 2.5% 초과의 다른 독소와의 서열 차이를 가지는 독소로 정의된다. 현재까지 7개의 혈청형에 걸쳐 BoNT의 40개 초과의 아형이 확인되었다. 상이한 혈청형은 상이한 기질 특이성을 가지고, BTx/A 및 BTx/E는 SNAP-25를 절단하고, 혈청형 /B, /D, /F 및 /G는 시냅토브레빈/VAMP를 절단한다. BTx/C는 SNAP-25 및 신탁신 1A 둘 다를 절단한다. 이 기질은 시냅스전 신경 말단에서 신경전달물질 방출에서 중요한 역할을 하고 모든 진핵 생물 세포로부터의 소포성 분비에 중요한 SNARE (SNAP(가용성 NSF 부착 단백질) 수용체) 단백질이다.

[0160] BTx의 3개의 도메인(LC, H_N , H_C)은 기능적으로 및 구조적으로 구별되고, 각각의 하위혈청형에 대한 각각의 도메인의 경계는 당해 분야에 정의되어 있다. (검토["Botulinum and tetanus neurotoxins:structure, function and therapeutic utility" by K. Turton et al., Trends in Biochemistry, 2002, 27:552-558](이 참고 문헌은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)를 참조한다). 50kDa 도메인의 각각은 예를 들어 키메라 단백질에서 서로 독립적으로 기능할 수 있다. H_N 도메인은 LC 주위를 둘러싸는 "벨트" 영역을 가지고, 이것은 유사저해제로서 거동하고 LC 전위 동안 샤큐론 기능을 가진다고 생각된다. 다양한 혈청형의 BTx 또는 TTx의 H_N 의 벨트 영역은 표 1에 기재되어 있다.

보툴리눔 신경독소 서열의 유도체화

[0162] 공개되지 않은 구조를 가지는 BTx 및 TTx 분자에 대해, loopp 체계화의 웹사이트에서 이용 가능한, 구조적 상동성 모델링 툴 LOOPP는 BTx/A1에 기초한 예측된 구조를 얻도록 사용되었다(3BTA.pdb). 이들, 및 Clustal Omega에 의한 모든 BTx 하위혈청형의 서열 정렬로부터, 도메인 사이의 전이 점을 확인할 수 있다. 현재까지 확인된 이 BTx 혈청형 및 아형에 대해 본 문헌의 끝에 Clustal BTx 서열 정렬이 제공된다.

[0163] LH_N = 보툴리눔 신경독소 촉매 도메인(LC) + 전위 도메인(H_N)

[0164] 예를 들어, $LH_N/A1(1-872번 잔기)$ 및 $LH_N/B1(1-859번 잔기)$ 과 같은 각각 하위혈청형에 대한 LH_N 도메인은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0165] LC 또는 L = 보툴리눔 신경독소 촉매 도메인(50kDa, pI 약 6.3-8.1)

[0166] $LC/A1(1-448번 잔기)$ 및 $LC/B1(1-441번 잔기)$ 와 같은 각각의 하위혈청형에 대한 LC 도메인은 이전에 US 2007/0166332(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 정의되어 있고, 하기 표 1에 요약되어 있다.

표 1

신경독소	수탁 번호	LC	벨트	H _N
BoNT/A1	A5HZZ9	1-448	449-546	449-872
BoNT/A2	X73423	1-448	449-546	449-872
BoNT/A3	DQ185900	1-444	445-542	445-869
BoNT/A4	EU341307	1-448	449-546	449-872
BoNT/A5	EU679004	1-448	449-546	449-872
BoNT/A6	FJ981696	1-448	449-546	449-872
BoNT/A7	JQ954960	1-448	449-546	449-872
BoNT/A8	KM233166	1-448	449-546	449-872
BoNT/B1	B1INP5	1-440	441-533	441-859
BoNT/B2	AB084152	1-440	441-533	441-859
BoNT/B3	EF028400	1-440	441-533	441-859
BoNT/B4	EF051570	1-440	441-533	441-859
BoNT/B5	EF033130	1-440	441-533	441-859
BoNT/B6	AB302852	1-440	441-533	441-859
BoNT/B7	JQ354985	1-440	441-533	441-859
BoNT/B8	JQ964806	1-440	441-533	441-859
BoNT/C1	P18640	1-441	442-542	442-867
BoNT/CD	AB200360	1-441	442-542	442-867
BoNT/DC	AB745660	1-445	446-538	446-863
BoNT/D	P19321	1-445	446-538	446-863
BoNT/E1	Q00496	1-422	423-515	423-846
BoNT/E2	EF028404	1-422	423-515	423-846
BoNT/E3	EF028403	1-422	423-515	423-846
BoNT/E4	AB088207	1-422	423-515	423-846
BoNT/E5	AB037711	1-422	423-515	423-846
BoNT/E6	AM695759	1-422	423-515	423-846
BoNT/E7	JN695729	1-422	423-515	423-846
BoNT/E8	JN695730	1-422	423-515	423-846
BoNT/E9	JX424534	1-422	423-515	423-846

[0167]

신경독소	수탁 번호	LC	벨트	H _N
BoNT/E10	KF861917	1-422	423-515	423-846
BoNT/E11	KF861875	1-422	423-515	423-846
BoNT/E12	KM370319	1-425	426-518	426-849
BoNT/F1	Q57236	1-439	440-534	440-865
BoNT/F2	GU213209	1-439	440-534	440-865
BoNT/F3	GU213227	1-439	440-534	440-865
BoNT/F4	GU213214	1-439	440-534	440-865
BoNT/F5	GU213211	1-438	439-531	439-862
BoNT/F6	M92906	1-439	440-534	440-864
BoNT/F7	GU213233	1-431	432-524	432-856
BoNT/G	Q60393	1-441	442-538	442-864
BoNT/ "H"	KG015617	1-434	435-528	435-860
TeNT	P04958	1-457	458-556	458-880

[0168]

[0169] 상기 확인된 기준 서열은 약간의 변형이 하위혈청형에 따라 발생할 수 있으므로 가이드로서 생각되어야 한다. 예로서, US 제2007/0166332호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)는 약간 상이한 클로스트리듐 서열을 인용한다:

[0170]

LC(SNARE에 대한 촉매 또는 효소 활성을 가짐):

[0171]

보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K448

[0172]

보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K441

[0173]

보툴리눔 유형 C1 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K449

[0174]

보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 M1-R445

[0175]

보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 M1-R422

[0176]

보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K439

[0177]

보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 M1-K446

[0178]

파상풍 신경독소: 아미노산 잔기 M1-A457

[0179]

H_N 도메인:

[0180]

보툴리눔 유형 A 신경독소: 아미노산 잔기 A449-K871

[0181]

보툴리눔 유형 B 신경독소: 아미노산 잔기 A442-S858

[0182]

보툴리눔 유형 C1 신경독소: 아미노산 잔기 T450-N866

[0183]

보툴리눔 유형 D 신경독소: 아미노산 잔기 D446-N862

[0184]

보툴리눔 유형 E 신경독소: 아미노산 잔기 K423-K845

[0185]

보툴리눔 유형 F 신경독소: 아미노산 잔기 A440-K864

[0186]

보툴리눔 유형 G 신경독소: 아미노산 잔기 S447-S863

- [0187] 파상풍 신경독소: 아미노산 잔기 S458-V879
- [0188] 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소
- [0189] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "저해제 시스테인 노트 독소" 또는 "ICK 독소"는 시스테인 노트 모티프를 포함하고 수용체 및/또는 이온 채널 표적의 활성을 조절하는 독소를 의미한다. 저해제 시스테인 노트(ICK)는 3개의 다이설파이드 브릿지를 함유하는 단백질 구조적 모티프이다. 이들 사이의 폴리펩타이드의 섹션을 따라, 2개의 다이설파이드는 (서열에서 제3 시스테인과 제6 시스테인을 연결하는) 제3 다이설파이드 결합이 통과하는 루프를 형성하여서, 노트(이에 따라 대안적인 명칭 노턴(knottin))을 형성한다. 모티프는 무척추동물 독소, 예컨대 거미류 및 연체동물로부터의 것에서 흔하다. 모티프는 또한 식물에서 발견되는 몇몇 저해제 단백질에서 발견되지만, 식물 및 동물 모티프는 수령 진화의 생성물인 것으로 생각된다. ICK 모티프는 열 변성 및 단백질분해에 내성인 매우 안정한 단백질 구조이다. 독의 ICK 웨بت아이드 성분은 전압 게이팅된 이온 채널을 표적화하지만, 패밀리의 구성원은 또한 항박테리아 및 용형 물질로서 작용한다. 식물 ICK 단백질은 대개 프로테아제 저해제이다. ICK 독소는 통상적으로 예를 들어 청자고등(cone snail), 거미 및 전갈의 독에서 발견된다. 몇몇 실시형태에서, ICK 독소는 다이설파이드 함유 웨بت아이드 독소이다. 이들 다이설파이드 함유 웨بت아이드 독소는 30개 내지 70개의 아미노산 잔기를 가진다. 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, ICK 독소는 코노톡신, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소이다.
- [0190] 후웬토톡신은 전압 게이팅된 칼슘 채널에 대해 작용하는 중국 조류 스파이더 거미로부터의 ICK 독소의 7개 유형(HWTX-1, HWTX-III, HWTX-IV, HWTX-X, HWTX-II, HWTX-VII, HWTX-VIII)이다.
- [0191] 엘타-팔루톡신은 전압 게이팅된 나트륨 채널에 대해 작용하는 거미로부터의 ICK 독소의 4개 유형(IT1, IT2, IT3, IT4)으로 이루어진다.
- [0192] 코노톡신은 전압 게이팅된 칼슘 및 나트륨 채널에 작용하는 청자고등으로부터의 작은 10개 내지 30개의 잔기 웨بت아이드 ICK 독소이다. 이들 독소 중 몇몇은 이온 채널의 활성을 조절하도록 세포외로 작용하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, W-코노톡신 GVIA 및 W-코노톡신 MVIIC.
- [0193] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "코노톡신"은 해양 청자고등(예를 들어, 코누스(Conus) 속)에 의해 생성된 독소를 의미한다. 몇몇 코노톡신은 이온 채널 활성을 조절할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 코노톡신은 이온 채널 조절제일 수 있다. 코노톡신의 비제한적인 예는 전압 의존적 나트륨 채널을 차단하는 것으로 공지된 δ -코노톡신(예를 들어, NCBI 번호: AKD43185; 서열 번호 10; 추가의 설명을 위해 예를 들어 문헌[Leipold et al. FEBS Letters 2005 579:3881-4](본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨) 참조), 전압 의존적 나트륨 채널을 또한 차단하는 μ -코노톡신(예를 들어, 스위스 프로트 번호: P15472.1; 서열 번호 9; 추가의 설명을 위해 예를 들어 문헌[Li and Tomaselli. Toxicol. 2004 44:117-122](본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨) 참조) 또는 N-유형 전압 의존적 칼슘 채널을 차단하는 것으로 공지된 ω -코노톡신 M VII A(예를 들어, NCBI 번호: ADB93081; 서열 번호 8; 추가의 설명을 위해 예를 들어 문헌[Nielsen et al. Molecular Recognition 2000 13:55-70](본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨) 참조)(예를 들어, 지코노타이드)를 포함할 수 있다. ICK 독소의 추가 비제한적인 예는 예를 들어 프살모톡신-1, β -TRTX-Tp2a 및 퓨로톡신-1을 포함하고, 문헌에 기재되어 있다(예를 들어, 미국 특허 공보 제20120277166호; 제20120220539호; 제20120087969호, 제20050214903호 및 제20050143560호; 문헌[Craik et al. Toxicon 2001 39:43-60; Zhu et al. FASEB Journal 2003 17:1765-7; Daly and Craik. Current Opinion in Chemical Biology 2011 15:362-368; Grishin. European Journal of Biochemistry 1999 264: 276-280; Liang et al. Toxicon 2004 43:575-585; Kolmar FEBS Journal 2008 275: 2684-2690; Saez et al. Toxins 2010 2:2851-2871; Vetter et al. Amino Acids 2011 40:15-28; Alewood et al. Australian Journal of Chemistry 2003 56:769-774; King. Expert Opinion on Biological Therapy 2011 11:1469-1484; King et al. Toxicon 2008 52:264-276; Herzig et al. Nucl. Acids Res 2010; Szeto et al. FEBS Letters 2000 470: 203-299; 및 Bergeron and Bingham. Toxins 2012 4:1082-1119](이들은 각각 본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨) 참조).
- [0194] 하기는 통각수용체 뉴런으로의 전달을 위한 PAd4, mPA, PA^{후린-}, LFn, EFn, 또는 다른 통각수용체 결합 단백질 등에 부착할 수 있는 ICK 독소로부터의 시스테인 노트 서열의 예이다.
- [0195] W-코노톡신 GVIA: CKSXGSSCSXTSYNCRSCNXYTKRCY(서열 번호 51)(변형: X = Hyp, 1 내지 16, 8 내지 19, 15 내지 26 사이의 다이설파이드 브릿지, Tyr-27 = C 말단 아미드)
- [0196] W-코노톡신 MVIIC: CKKGKGAPCRKTMYDCCSGSGCGRRGKC(서열 번호 52)(변형: 1 내지 16, 8 내지 20, 15 내지 26 사이

의 다이설파이드 브릿지, Cys-26 = C 말단 아미드)

[0197] W-아가톡신 IVA: KKCIAKDYGRCKWGGTPCCRGRGCICSIMGTNCECKPRLIMEGLGLA(서열 번호 53)(변형: 4 내지 20, 12 내지 25, 19 내지 36, 27 내지 34 사이의 다이설파이드 브릿지)

[0198] W-아가톡신 TK: EDNCIAEDYKGCTWGGTKCCRGRPCRCMSIGTNCECTPRLIMEGLSFA(서열 번호 54)(변형: 4 내지 20, 12 내지 25, 19 내지 36, 27 내지 34 사이의 다이설파이드 브릿지)

[0199] 후웬토톡신 IV: ECLEIFKACNPSNDQCKSSKLVCSRKTRWCKYQI(서열 번호 55) (변형: 다이설파이드 브릿지: 2 내지 17, 9 내지 24, 16 내지 31)(변형: Ile-35 = C 말단 아미드)

[0200] ProTx II: YCQKWMWTCDSERKCCEGMVCRWLWCKKKLW(서열 번호 56)(변형: 다이설파이드 브릿지: 2 내지 16, 9 내지 21, 15 내지 25)

AB 독소

[0202] AB 독소는 다수의 병원성 박테리아에 의해 분비되는 2성분 단백질 복합체이다. 이것은 이의 성분으로 인해 AB 독소라 칭해진다: "A" 성분은 보통 "활성" 부분이고, "B" 성분은 보통 "결합" 부분이다. "A" 아단위는 효소 활성을 보유하고, 여기서 촉매 도메인 또는 활성이 발견되고, 막 결합된 수송 "B" 아단위에서의 배좌 변화 후 숙주 세포로 전달된다. 소정의 클로스트리듐 종에 의해 생성된 독소는 2원 외독소이다. 이들 단백질은 A/B 아단위 모이어티에 상응하는 2개의 독립적인 폴리펩타이드로 이루어진다. 효소 성분(A)은 올리고머 결합/전위 단백질 (B)에 의해 생성된 엔도솜을 통해 세포에 진입하고, 단량체 G-액틴의 ADP-리보실화를 통한 액틴 중합을 방지한다.

[0203] 2원 독소 패밀리의 "A" 성분의 예는 씨. 페르프린젠스 이오타 독소 Ia, 씨. 보툴리눔 C2 독소 CI 및 클로스트리듐 디피실 ADP-리보실전환효소를 포함한다. 다른 상동성 단백질은 클로스트리듐 스피로포르메에서 발견된다.

[0204] 2원 독소 패밀리의 "B" 성분(결합 또는 수송 성분으로 공지된)의 예는 본 명세서에 기재된 바실러스 안트라시스 보호성 항원(PA) 단백질을 포함한다.

[0205] 디프테리아 독소(DT)는 또한 AB 독소이다. 이것은 단백질 합성에 필수 성분인 진핵생물 연장 인자 2의 인산화를 통해 숙주 세포에서 단백질 합성을 저해한다. 슈도모나스 아에루기노사의 외독소 A는 진핵생물 연장 인자 2를 표적화하는 AB 독소의 또 다른 예이다.

조작된 융합 키메라 단백질

BTx/TTx-PAd4/PA 융합 단백질

[0208] PAd4 결합을 통해 통각수용체에 TTx 또는 하나의 또는 또 다른 BTx의 작용을 재지시하도록 허용하는 PAd4에 융합된 BTx 또는 TTx가 본 명세서에 포함된다. 이것은 수용체 결합 도메인이 탄저병 PA의 수용체 결합 기능에 의해 대체되는 BTx를 포함한다. 이 작제물에서, 본 발명자들은 BTx의 C 말단 도메인을 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인, PAd4 또는 PA63, 또는 임의의 PA 단편(여전히 수용체 ANTXR2에 결합할 수 있음)에 의해 대체한다. BTx 경쇄(효소 모이어티는 L 사슬에 포함됨) 및 전위 도메인(H_N)은 PA의 수용체 결합 도메인에 연결된다. (도 7a 참조) PA의 C 말단 수용체 결합 도메인, 예를 들어 PAd4는 작제물/융합 단백질을 통각수용체 상의 ANTXR2 수용체에 결합시키고, 엔도솜으로의 이동을 매개할 것이고, 이 지점에서 BTx 기공 형성 도메인(H_N)은 막으로 삽입하고, 시토솔로의 BTx L 사슬의 전위를 매개할 것이고, 이 시토솔에서 이것은 SNARE를 절단하고 신경전달물질 방출을 차단할 것이다. PA는 이의 수용체 ANTXR2(CMG2)를 표적화할 것이고, 보툴리눔 독소 H_N 도메인은 기공 형성, 전위 및 효소 모이어티가 시냅스 기능을 차단하도록 촉발할 것이다. 몇몇 실시형태에서, 이 전략은 보툴리눔 또는 파상풍 독소가 세포외 및 세포내 둘 다로 작용할 것을 요한다. 몇몇 실시형태에서, 이 전략은 Lys-C 효소에 의한 독소의 예비활성화를 요한다. 이 접근법은 파상풍 독소의 중쇄 및 경쇄 도메인에서 전위 도메인에 유사하게 적용될 수 있다. (도 7b 참조). 접합부를 절단하기에 적합한 다른 프로테아제는 라이실 펩티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0209] 따라서, 일 양태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) PAd4 및 (b) BTx 또는 TTx(여기서, PAd4는 BTx 또는 TTx와 융합되거나 연결됨)를 포함한다. BTx 또는 TTx는 SNARE 표적화 프로테아제이다. 일 실시형태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) PAd4 및 (b) SNARE 표적화 프로테아제(여기서, PAd4는 SNARE 표적화 프로테아제와 융합되거나 연결됨)를 포함한다. 조작된 융합 단백질의 일 실시형태에서, PAd4 도메인은 PA에 의해 대체된다. 일 실시형태에서,

PA는 퓨린에 의한 절단에 저항성인 변이체 PA 돌연변이체 형태이다. 또 다른 양태에서, 본 발명자들은 (a) PAd4 및 (b) SNARE 표적화 프로테아제(여기서, PAd4는 SNARE 표적화 프로테아제와 융합되거나 연결됨)를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, (a) PAd4 및 (b) BTx 또는 TTx(여기서, PAd4는 BTx 또는 TTx와 융합되거나 연결됨)를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 조성물의 또 다른 실시형태에서, 조작된 융합 단백질의 PAd4 도메인은 PAd4 대신에 PA를 포함한다. 일 실시형태에서, PA는 퓨린에 의한 절단에 저항성인 변이체 PA 돌연변이체 형태이다. 본 명세서에 기재된 임의의 융합 폴리펩타이드 조성물의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0210] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4 또는 PA는 웨პ타이드 링커에 의해 TTx, BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제와 연결된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 링커 웨პ타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4 또는 PA는 BTx 또는 TTx 신경독소의 네이티브 수용체 결합 도메인을 대체할 수 있거나, 네이티브 수용체 결합 기능이 돌연변이에 의해 제거된 BTx 또는 TTx 신경독소 중 하나의 형태에 융합된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 전체 단백질, 즉 네이티브 수용체 결합 기능이 돌연변이에 의해 제거된 홀로톡신을 포함한다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 전체 단백질, 즉 네이티브 수용체 결합 기능이 돌연변이에 의해 제거된 홀로톡신으로 이루어진다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 홀로톡신, 예를 들어 홀로톡신 단백질의 1개 또는 2개의 도메인보다는 단백질의 오직 일부를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 예를 들어, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제 요소는 본질적으로 LC 및 H_N (LH_N) of TTx, BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제로 이루어질 수 있다.

[0211] 또 다른 양태에서, (a) N 말단 효소 도메인(LC)을 포함하는 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티 및 (b) BTx의 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N) 및 (c) 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)을 포함하는, 융합 단백질(여기서, 파트 (a)-(c)는 함께 연결되고, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 링커 웨პ타이드에 의해 함께 연결됨)이 본 명세서에 기재되어 있다. 즉, BTx의 L H_N 은 링커 웨პ타이드에 의해 PA의 PAd4 도메인에 융합되고, 여기서 PAd4는 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인이다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, PA는 PAd4 대신에 포함된다. 일 실시형태에서, PA는 퓨린에 의한 절단에 저항성인 변이체 PA 돌연변이체 형태이다. 또 다른 양태에서, (a) N 말단 효소 도메인(LC)을 포함하는 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티 및 (b) BTx의 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N) 및 (c) 탄저병 독소 보호성 항원(PAd4 도메인)의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물(여기서, 파트 (a)-(c)는 함께 연결됨)이 본 명세서에 기재되어 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 융합 단백질에서 PAd4 도메인 대신에 PA를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, PA는 퓨린에 의한 절단에 저항성인 변이체 PA 돌연변이체 형태이다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0212] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx 모이어티는 클로스트리듐 BTx 혈청형 중 임의의 하나의 BTx 경쇄(LC) 및 중쇄(HC) 도메인으로부터 선택된다: BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소.

[0213] 또 다른 양태에서, (a) 과상풍 신경독소(TTx)의 N 말단 효소 도메인(LC), (b) TTx의 전위/기공 형성 도메인(H_N) 및 (c) 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)을 포함하는, 융합 단백질(여기서, 융합 단백질의 파트 (a)-(c)는 함께 연결되고, 예를 들어 본 명세서에 기재된 링커 웨პ타이드에 의해 함께 작동적으로 연결됨)이 본 명세서에 기재되어 있다. 즉, aTTx의 LH_N 은 링커 웨პ타이드에 의해 PA의 PAd4 도메인에 융합되고, 여기서 PAd4는 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인이다. 일 실시형태에서, (a) 과상풍 신경독소(TTx)의 N 말단 효소 도메인(LC), (b) TTx의 전위/기공 형성 도메인(H_N) 및 (c) 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물(여기서, 융합 단백질의 파트 (a)-(c)는 함께 연결됨)이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함

할 수 있다. 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, TTx의 경쇄와 TTx의 중쇄 사이의 접합부에 상응하는 아미노산 잔기는 절단된다.

[0214] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx의 HC(헬청형 포함됨) 또는 TTx와의 LC 접합부에 상응하는 아미노산 잔기는 절단된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx의 H_N(헬청형 포함됨) 또는 TTx와의 LC 접합부에 상응하는 아미노산 잔기는 절단된다. 절단은 프로테아제, 예컨대 라이실 웨티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C(이들로 제한되지는 않음)에 의해 수행된다.

[0215] BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, BTx 모이어티는 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인은 링커 웨타이드에 의해 연결된다. BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인을 포함하는 BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인은 프로테아제, 예를 들어 Lys-C에 의한 절단에 의해 분비된다. 링커 웨타이드에 의해 연결된 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인을 포함하는 BTx 모이어티를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인은 예를 들어 프로테아제, 예를 들어 Lys-C에 의한 절단에 의해 분비된다. 절단은 융합 단백질에서 효소 모이어티 및 전위 웨타이드/도메인을 활성화하도록 기능한다.

[0216] BTx 모이어티(여기서, BTx 모이어티는 BTx의 H_N 도메인 및 L 사슬을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어짐)를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, L 사슬과 H_N 도메인 사이의 S-S 브릿지는 환원되지 않는다. BTx 모이어티(여기서, BTx 모이어티는 BTx의 H_N 도메인이 아니라 L 사슬을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어짐)를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서 L 사슬에서의 Cys 잔기 및 홀로톡신에서의 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트는, 존재하는 경우, Ala, Ser 또는 Thr로 변경될 수 있다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함한다. N 말단에서의 D-아미노산 잔기는 융합 단백질의 잠재적인 면역원성을 감소시키도록 작용한다.

[0217] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4는 웨타이드 링커에 의해 LH_N rhk과 연결된다. 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 PA의 N 말단 측으로부터의 약 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 융합 단백질의 효소/기공 형성 도메인과 수용체 결합 PAd4 융합 파트너 사이에 추가로 혼입된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4는 융합 단백질의 C 말단에 위치하고, LH_N은 융합 단백질의 N 말단에 있다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4는 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, PAd4는, 2개의 PAd4 도메인 사이에 샌드위칭된 LH_N(LC 및 H_N)에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, 융합 단백질에서 1개 초파의 PAd4 도메인, 예를 들어 2개 내지 10개의 PAd4 도메인, 1개 내지 5개의 PAd4 도메인, 또는 2개 내지 5개의 PAd4 도메인이 있다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물(여기서, 다수의 PAd4 도메인이 존재함)의 일 실시형태에서, 다수의 PAd4 도메인은 텐덤으로 배열된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다수의 PAd4 도메인은 웨타이드 링커에 의해 연결된다. 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다.

BTx/TTx-Fn/EFn 융합 단백질

[0218] TTx의 촉매 도메인 또는 BTx의 1개의 또는 또 다른 다양한 형태/헬청형의 촉매 도메인에 융합된 LFn을 포함하는 네이티브 PA 및 융합 단백질은, 조합되어 사용될 때, 통각수용체 뉴런에서의 세포내 신호전달을 방해하거나 신경전달물질을 통한 시냅스 전달을 차단하도록 지시될 수 있다. (도 8a 및 도 8b 참조) 이 작제물은 SNARE 단백질을 절단하고 이로써 통각수용체 또는 방관자 세포를 살해하지 않으면서 신경전달물질 방출을 차단하도록 촉매 도메인의 단백질분해 활성을 사용한다. TTx 또는 독소의 BTx 또는 CNT 패밀리의 하나의 또는 또 다른 다양한 형태/헬청형은 SNARE 표적화 프로테아제이다. 따라서, 일 양태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) LFn 및 (b) SNARE 표적화 프로테아제를 포함한다. 일 실시형태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) LFn 및 (b) TTx 또는 BTx를 포함한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, LFn은 웨타이드 링커에 의해 TTx, BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제와 연결된다. 일 실시형태에서, (a) LFn 및 (b) TTx 또는 BTx를 포함하는, 조작된 융합 단백질

을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, (a) LFn 및 (b) SNARE 표적화 프로테아제를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, 융합 단백질 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은 펩타이드 링커에 의해 TTx, BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제와 연결된다. 일 실시형태에서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은, 2개의 LFn 사이에 샌드위치된 TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, EFn은 LFn 대신에 포함된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 전체 단백질, 즉 홀로톡신을 포함한다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 본질적으로 전체 단백질, 즉 홀로톡신으로 이루어진다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 전체 단백질, 즉 홀로톡신으로 이루어진다. 홀로톡신을 함유하는 융합 단백질은 단백질분해 절단에 의해 활성화될 필요가 있을 것이다. 홀로톡신을 활성화하기에 적합한 프로테아제는 라이실 펩티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 접합부를 절단하기에 적합한 프로테아제는 라이실 펩티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 홀로톡신, 예를 들어 홀로톡신의 도메인이 아니라 오직 단백질의 부분을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진다. 예를 들어, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 본질적으로 TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제의 LC 또는 LC 및 H_N(LH_N)으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, TTx 또는 BTx 또는 SNARE 표적화 프로테아제는 본질적으로 LC와 홀로톡신의 N 말단에 위치한 벨트 분절로 이루어질 수 있고, 벨트 분절은 L 사슬과 H_N 사슬 사이에 발견된다. 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx는 혈청형 중 임의의 하나의 BTx 경쇄(LC) 및 중쇄(HC) 도메인으로부터 선택된다: BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소. 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx는 비제한적인 예로서 표 1로부터의 BTx 경쇄(LC) 및 중쇄(HC) 도메인으로부터 선택되고, 서열 번호 29-31을 참조한다.

[0220]

따라서, 일 양태에서, (a) 보툴리눔 신경독소(BTx)의 효소 모이어티 또는 파상풍 신경독소(TTx)의 효소 모이어티 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn); 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. BTx의 효소 모이어티는 보툴리눔 신경독소 홀로톡신의 N 말단에 위치한다. 일 실시형태에서, (a) 보툴리눔 신경독소(BTx)의 효소 모이어티 또는 파상풍 신경독소(TTx)의 효소 모이어티 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn); 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0221]

일 양태에서, (a) 비세포독성 프로테아제(여기서, 프로테아제는 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있음); 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, (a) 비세포독성 프로테아제(여기서, 프로테아제는 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있음); 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 PA 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0222]

본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 클로스트리듐 신경독소 L 사슬(LC) 또는 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 L 사슬을 포함한다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소 L 사슬(LC) 또는 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 L 사슬은 효소 모이어티이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 제1 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 및 TTx 중 임의의 하나의 BTx 경

쇄 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 비세포독성 프로테아제는 BTx/A LC(1-448번 a.a.), BTx/B LC(1-441번 a.a.), BTx/C LC(1-449번 a.a.), BTx/D LC(1-442번 a.a.), BTx/E LC(1-422번 a.a.), BTx/F LC(1-436번 a.a.) 및 BTx/G LC(1-442번 a.a.)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, BTx 경쇄는 서열 번호 20-28 또는 본 명세서에 기재된 표 1로부터 선택될 수 있다.

[0223] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 클로스트리듐 신경독소는 BTx 또는 TTx이다.

[0224] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)이다.

[0225] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA에 결합할 수 있는 단백질은 (i) 탄저병 독소 치사 인자(LF); 또는 (ii) 탄저병 독소 부종 인자(EF)이다.

[0226] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LF의 PA 결합 도메인은 LF의 N 말단 도메인(LFPABD 또는 LFn이라 측약됨)이다.

[0227] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, EF의 PA 결합 도메인은 EF의 N 말단 도메인(EFPABD 또는 EFn이라 측약됨)이다.

[0228] 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 및 EFn은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태에 결합하는 도메인이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 효소 도메인은 본 명세서에 기재된 LC of BTx 또는 TTx이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 효소 도메인은 LFn 또는 EFn에 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 펩타이드 링커에 의해 효소 도메인 또는 LC of BTx 또는 TTx와 연결된다. 일 실시형태에서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 2개의 LFn 또는 EFn 사이에 샌드위치된 BTx 또는 TTx의 LC 또는 N 말단 효소 도메인에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트를 한정하는 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 H_N 도메인은 BTx의 C 말단 측에 위치한다.

[0229] 융합 단백질이 BTx 또는 TTx의 L 및 H_N 둘 다, 예를 들어 1-872번 아미노산(서열 번호 29)을 포함하는, 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, BTx의 H_N와의 LC 접합부에 상응하는 아미노산 잔기는 절단된다. 접합부를 절단하기에 적합한 프로테아제는 라이실 펩티다제, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 세몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. BTx 모이어티(여기서, BTx 모이어티는 BTx의 L 사슬 및 H_N 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어짐)를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, L 사슬과 H_N 도메인 사이의 S-S 브릿지는 환원되지 않는다. BTx 모이어티(여기서, BTx 모이어티는 BTx의 H_N 도메인이 아니라 L 사슬을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어짐)를 포함하는 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, L 사슬에서의 Cys 잔기 및 홀로톡신에서의 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트는, 존재하는 경우, Ala, Ser 또는 Thr로 변경된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함한다. D-아미노산은 소르타제(Sortase) 반응에 의해 첨가될 수 있고, 예를 들어 국제 특허 공보 WO 제2012/096926호; US 특허 제9079952호, 및 US 특허 출원 공보 제US 2013/0336974호 및 US 제2015/0267186호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 더 자세히 기재되어 있다.

[0230] LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 이들 융합 단백질은 비융합된 PA와 함께 사용되거나, (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 통각수용체 뉴런으로 지시함)을 포함하는 제2 융합 단백질과 함께 사용된다. 즉, 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 별개의 비융합된 PA 폴리펩타이드와 동시 투여된다. 또 다른 실시형태에서, LFn 또

는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 제2 융합 단백질과 동시 투여된다. 제2 융합 단백질은 (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 함유하는 제1 융합 단백질을 통각수용체 뉴런으로 지시함)을 포함한다. 제2 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, PA는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTXR2 수용체에 결합하지 않는 변이체(mPA), 변형된 또는 돌연변이된 형태이다.

[0231] 일 양태에서, 이후,

[0232] (I) (a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티, 효소 도메인, 또는 파상풍 신경독소(TTx) 모이어티, 효소 도메인의 보툴리눔 신경독소 N 말단 효소 도메인 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는 제1 융합 단백질, 및

[0233] (II) (c) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편, 및 임의로 (d) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 제2 단백질

[0234] 을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고,

[0235] 여기서, 파트 (a) 및 (b)는 웨타이드 링커에 의해 연결되고, 파트 (d)가 존재할 때, 파트 (c) 및 (d)는 또한 웨타이드 링커에 의해 연결된다. 기재된 조성물의 일 실시형태에서, 제2 단백질이 융합 단백질인 경우, PA는 mPA인 PA의 돌연변이체 변이체이다.

[0236] 본 명세서에 기재된 임의의 독소 단백질, 독소 융합 단백질 또는 융합 단백질 조성물의 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 링커 웨타이드를 포함하는 조성물의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 단편의 비제한적인 예는 PA63이다. 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 일 실시형태에서, PA는 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질이다. 본 명세서에 기재된 조성물의 일 실시형태에서, PA는 융합 단백질에 결합할 수 있는 올리고머 PA이다. 일 실시형태에서, 이 조성물은 통증, 예컨대 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증, 및 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애의 치료에 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 이 조성물은 통증의 치료를 위한 약제의 제조에 유용하다.

AB 독소-LFn/EFn 융합 단백질

[0237] 조합의 네이티브 PA 및 융합 단백질 LFn-DT는 단백질 합성을 차단하도록 디프테리아 독소(DT)의 촉매 도메인 ("A" 성분 또는 "A" 파트로 공지됨)을 사용하여 통각수용체 뉴런으로 지시될 수 있다. DT는 AB 유형 독소이다. 따라서, 일 양태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) LFn 및 (b) DT를 포함한다. 일 실시형태에서, (a) LFn 및 (b) DT를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, LFn은 웨타이드 링커에 의해 DT에 연결된다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, DT는 서열 번호 2에서 발견되는 A 파트 및 B 파트 둘 다를 포함한다. 일 실시형태에서, DT는 서열 번호 2에서 발견되는 A 파트 (활성 촉매/효소 도메인)를 포함하는 DTA이다. DTA 아미노산 서열은 디프테리아 독소의 1-193번 잔기를 포함한다. LFn을 포함하는 조작된 융합 단백질의 일 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. LFn을 포함하는 조작된 융합 단백질의 또 다른 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. LFn을 포함하는 조작된 융합 단백질의 또 다른 실시형태에서, LFn은, 2개의 LFn 사이에 샌드위치된 DT에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, LFn은 EFn에 의해 대체된다. 따라서, 일 실시형태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) EFn 및 (b) DT를 포함한다. 일 실시형태에서, (a) EFn 및 (b) DT를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0238] 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 몇몇 실시형태에서, 다른 세포내로 작용하는 독소, 예컨대 식물 독소, 리신, 또는 다이실파이드 함유 웨타이드 독소, 예컨대 ICK 독소의 촉매 도메인은 DT 대신에 LFn에 융합되어서, 조작된 융합 단백질, 예컨대 LFn-PE (PTx), LFn-코노톡신, LFn-리신, LFn-콜레라 독소, LFn-아가톡신, LFn-엘타-팔루톡신, LFn-후웬토톡신, LFn-전갈 장쇄 독소, 및/또는 LFn-쉬가 독소를 제공한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은 하나의 다른 독소와 연결되고, 다른 독소는 세포내로 작용하는 독소이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 세포내로 작용하는 독소는 리신, PE, 코노톡신, 콜레라 독소, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬토톡신, 쉬가 독소, 전갈 장쇄 독소 및 전갈 단쇄 독소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은

펩타이드 링커에 의해 다른 독소에 연결된다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, LFn은 탄저병 독소로부터 유래하지 않은 적어도 하나의 다른 독소와 연결된다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, LFn은 AB 독소의 A 성분 또는 활성 촉매 또는 효소 도메인, 예를 들어 PE의 364-613번 아미노산 잔기 사이의 A 성분 잔기에 연결되고, A 파트 잔기는 DT의 1-193이다.

[0240] 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, LFn은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn은, 2개의 LFn 사이에 샌드위치된 세포내로 작용하는 독소에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, EFn은 LFn 대신에 포함된다. 예를 들어, 이것은 조작된 융합 단백질, 예컨대 EFn-PE (PTx), EFn-코노톡신, EFn-리신, EFn-콜레라 독소, EFn-아가톡신, EFn-델타-팔루톡신 EFn-후웬토톡신 또는 EFn-쉬가 독소를 제공한다.

[0241] LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 또 다른 실시형태에서의 몇몇 실시형태에서, 이를 융합 단백질은 비융합된 또는 별개의 PA와 함께 사용되거나, 통증을 치료하기 위해 제2 융합 단백질과 함께 사용될 수 있다. 즉, 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF 폴리펩타이드를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하기 위해 대상체에게 PA와 동시 투여된다. 또 다른 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하기 위해 대상체에게 제2 융합 단백질과 동시 투여된다. 제2 융합 단백질은 (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 함유하는 제1 융합 단백질을 통각수용체 뉴런으로 지시함)을 포함한다. 제2 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, PA는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTR2 수용체에 결합하지 않는 형태인 네이티브 PA의 돌연변이체 변이체(mPA)이다.

[0242] 일 실시형태에서,

[0243] (I) (a) DT, 세포내로 작용하는 독소, ICK 독소 또는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는 제1 융합 단백질, 및

[0244] (II) (c) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편, 및 임의로 (d) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 제2 단백질

[0245] 을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고,

[0246] 여기서, 파트 (a) 및 (b)는 펩타이드 링커에 의해 연결되고,

[0247] 여기서, (d)가 존재할 때, 파트 (c) 및 (d)는 또한 펩타이드 링커에 의해 연결된다. 기재된 조성물의 일 실시형태에서, 제2 단백질이 융합 단백질일 때, PA는 mPA인 PA의 돌연변이체 변이체이다.

[0248] 조성물의 일 실시형태에서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 단편의 비제한적인 예는 PA63이다. PA 단백질을 포함하는 본 명세서에 기재된 조성물의 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 또 다른 실시형태에서, PA는 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질이다. 또 다른 실시형태에서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된다.

[0249] 일 실시형태에서, 독소 및/또는 독소 융합을 포함하는 본 명세서에 기재된 조성물은 통증, 예컨대 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증, 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애의 치료에 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 이 조성물은 통증의 치료를 위한 약제의 제조에 유용하다.

[0250] AB 독소-PAd4/PA 융합 단백질

[0251] 또 다른 양태에서, 링커 펩타이드에 융합된 AB 독소를 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공되고, 이 링커 펩타이드는 이후 PA의 PAd4 도메인에 연결되고, PAd4는 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인이고, 융합 단백질은 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함한다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, PA는 PAd4 도메인 대신에 사용된다. 일 실시형태에서, PA는 (PA^{퓨린-})인 퓨린에 의한 절단에 저항성인

변이체 PA 돌연변이체 형태이다.

- [0252] 일 실시형태에서, PA의 PAd4 도메인에 작동적으로 연결된 링커 웹타이드에 융합된 AB 독소를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고, 여기서 PAd4는 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인이고, 융합 단백질은 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함한다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, PA는 PAd4 도메인 대신에 사용된다. 일 실시형태에서, PA는 (PA^{퓨린})인 퓨린에 의한 절단에 저항성인 변이체 PA 돌연변이체 형태이다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0253] 일 양태에서, (a) AB 독소; (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 PA 단편(여기서, PA 또는 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함); 및 (c) 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토졸로 프로테아제를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(TL)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.
- [0254] 일 실시형태에서, (a) AB 독소; (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 PA 단편(여기서, PA 또는 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함); 및 (c) 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토졸로 독소, 프로테아제를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(TL)을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0255] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쇠가 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된다.
- [0256] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTRX2(CMG2)이다.
- [0257] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA 단편은 비제한적인 예로서 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인, 예를 들어 PAd3, PAd2 및 PAd4 또는 PAd4이다.
- [0258] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 서열 번호 35-40의 아미노산 서열을 가지는 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA 단편은 서열 번호 35-40의 아미노산 서열을 가지는 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다.
- [0259] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 막 삽입 및 헵타머화에 관여한 PAd2를 포함한다. 일 실시형태에서, PAd2는 PA의 259-487번 잔기(서열 번호 1)에 위치한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 숙주세포 수용체 결합에 관여한 PAd4를 포함한다. 일 실시형태에서, PAd4는 PA의 595-735번 잔기(서열 번호 1)에 위치한다.
- [0260] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA의 PAd2 및 PAd4 도메인을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 예를 들어, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA의 259-487 및 488-735번 잔기(서열 번호 1)를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 대안적으로, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA의 259-487 및 488-764번 잔기(서열 번호 1)를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.
- [0261] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4 또는 PA 단편은 웹타이드 링커에 의해 AB 독소와 연결된다. 일 실시형태에서, 링커 웹타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터의 대략 약 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 AB 독소와 PAd4 사이에 추가로 혼입된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4는 융합 단백질의 C 말단에 위치하고, AB 독소는 융합 단백질의 C 말단에 있다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, PAd4는 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, PAd4는, 2개의 PAd4 도메인 사이에 샌드위치된 AB 독소에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다. 융합 단백질 또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, 텐덤으로 융합 단백질에서 1개 초과의 PAd4 도메인, 예를 들어 2개 내지 10개의 PAd4 도메인, 1개 내지 5개의 PAd4 도메인, 2개 내지 5개의 PAd4 도메인이 있다. 다

수의 PAd4 도메인이 존재하는, 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다수의 PAd4 도메인은 팬덤으로 배열된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다수의 PAd4 도메인은 웹타이드 링커에 의해 연결된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TL, 전위 도메인; 홀로톡신; 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태는 AB 독소와 PAd4 또는 PA 단편 사이에 샌드위치된다.

[0262] 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쉬가 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, TL은 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인; 홀로톡신; 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 몇몇 실시형태에서, 전위 도메인은 BTx 또는 TTx, 예를 들어 표 1에 개시된 바와 같은 BTx 또는 TTx의 H_N(클로스트리듐 신경독소 전위 도메인)으로부터 유래하거나, 전위 도메인은 탄저병 독소, 예를 들어 LFn 또는 EFn, 또는 본 명세서에 기재된 다중양이온성 서열로부터 유래한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 몇몇 실시형태에서, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태는 리신 독소, 콜레라 독소, PE; 쉬가 독소, DT; 및 전갈 장쇄 또는 단쇄 독소로부터 선택된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 몇몇 실시형태에서, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태는 전체 PA 단백질에 대해 예를 들어 PA, mPA 또는 PA 퓨린⁻이고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위(서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웹타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기)는 퓨린 내성 아미노산 서열, 예컨대 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)에 의해 대체된다.

[0263] LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 이들 융합 단백질은 비융합된 또는 별개의 PA와 함께 사용되거나, (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 통각수용체 뉴런으로 지시함)을 포함하는 제2 융합 단백질과 함께 사용될 수 있다. 즉, 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 PA 단독과 동시 투여된다. 또 다른 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 제2 융합 단백질과 동시 투여된다. 이러한 상황에서, 제2 융합 단백질은 (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 포함하는 제1 융합 단백질을 통각수용체 뉴런으로 지시함)을 포함한다. 제2 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, PA는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTXR2 수용체에 결합하지 않는 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 형태(mPA)인 변이체이다.

[0264] 일 양태에서,

[0265] (I) (a) AB 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는 제1 융합 단백질, 및

[0266] (II) (c) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편, 및 임의로 (d) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 제2 단백질(여기서, 파트 (a) 및 (b)는 웹타이드 링커에 의해 연결되고, 파트 (d)가 존재할 때, 파트 (c) 및 (d)는 또한 웹타이드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 기재된 조성물의 일 실시형태에서, 제2 단백질이 융합 단백질일 때, PA는 mPA인 PA의 돌연변이체 변이체이다.

[0267] 조성물의 일 실시형태에서, 링커 웹타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 단편의 예는 PA63이다. 본 명세서에 기재된 임의의 하나의 조성물의 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 본 명세서에 기재된 임의의 하나의 조성물의 일 실시형태에서, PA는 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질이다. 일 실시형태에서, PA는 올리고머 PA이다. 일 실시형태에서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된다. 일 실시형태에서, 이 조성물은 통증, 예컨대 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증, 및 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애의 치료에 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 이 조성물은 통증의 치료를 위한 약제의 제조에 유용하다.

[0268] ICK 독소-PAd4/PA 융합 단백질

[0269] 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))에 의해 탄저병 독소 성분을 조작하는 것이 본 명세

서에 또한 기재되어 있다. 몇몇 ICK 독소가 이온 채널의 활성을 조절하는 것으로 공지되어 있으므로, 이들은 통증을 치료하기 위해 사용되지만, 통각수용체 이외의 세포형에 대한 효과는 전신 치료를 방해한다. 이 독소가 PAd4 또는 네이티브 PA에 융합되거나, 그렇지 않으면 이것을 장식하도록 사용되는 경우, 이것은 통각수용체에 특이적으로 표적화될 수 있다. (도 9 참조) 따라서, 일 양태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) PAd4 또는 네이티브 PA 또는 이의 수용체 결합 단편 및 (b) ICK 독소를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, (a) PAd4 또는 네이티브 PA 또는 이의 수용체 결합 단편 및 (b) ICK 독소를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. PAd4 또는 네이티브 PA 또는 이의 수용체 결합 단편은 웹타이드 링커에 의해 ICK 독소에 융합될 수 있다. 일 실시형태에서, 링커 웹타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다.

[0270] ICK 독소-Fn/EFn 융합 단백질

대안적으로, ICK 독소는 통각수용체에 특이적으로 영향을 미치도록 LFn 또는 EFn, 또는 LFn 또는 EFn을 함유하는 융합 단백질과 융합될 수 있고, 이들은 이후 PA, 또는 PA의 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 형태와 조합되어 사용될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, (a) LFn 및 (b) ICK 독소를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, (a) EFn 및 (b) ICK 독소를 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, (a) ICK 독소 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, (a) LFn 및 (b) ICK 독소를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 실시형태에서, (a) EFn 및 (b) ICK 독소를 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 실시형태에서, (a) ICK 독소 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 ICK 독소를 통각수용체 뉴런으로 특이적으로 지시하는 것을 돋는다. 유사하게, PA 또는 PA의 변이체 형태 또는 이의 수용체 결합 단편과 함께 LFn 또는 EFn은 독소를 통각수용체 뉴런으로 및 시토졸로 직접적으로 전달하는 것을 돋는다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn, EFn, 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 웹타이드 링커에 의해 ICK 독소에 융합된다. 일 실시형태에서, 링커 웹타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn, EFn, 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn, EFn, 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, LFn, EFn, 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은, LFn, EFn, 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질 사이에 샌드위치된, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다.

[0272] 다이설파이드 함유 웹타이드 독소-Fn/EFn 융합 단백질

또 다른 양태에서, (a) 다이설파이드 함유 웹타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인 (LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인 (EFn)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, (a) 다이설파이드 함유 웹타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인 (LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인 (EFn)을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웹타이드 독소는 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결되거나, 하나 이상의 부위에서 LFn 또는 EFn에 대에 화학적으로 가교결합된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웹타이드 독소는 LFn 또는 EFn에 연결된다. LFn은 탄저병 독소 치사 인자의 도메인이고, 이것은 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태인 PA63의 올리고머 형태에 결합한다. EFn은 도메인이 PA63의 올리고머 형태에 결합하는 탄저병 독소 부종 인자의 도메인이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웹타이드 독소는 저해제 시스테인 노트 독소 (ICK) 독소이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웹타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소이다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 파트 (a)는 링커 웹타이드에 의해 파트 (b)와 융합된다. 일 실시형태에서, 링커 웹타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn은 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 융합 단백질

또는 조성물의 또 다른 실시형태에서, LFn 또는 EFn은, 2개의 LFn 또는 EFn 사이에 샌드위칭된 다이설파이드 함유 웨타이드 독소에 의해, 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치한다.

[0275] 일 양태에서, (a) 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 기재되어 있다. 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소이다. 일 실시형태에서, (a) 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, PA 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0276] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함할 수 있다.

[0277] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 델타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소일 수 있다.

[0278] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)일 수 있다.

[0279] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, PA에 결합할 수 있는 단백질은 (i) 탄저병 독소 치사 인자(LF); 또는 (ii) 탄저병 독소 부종 인자(EF)일 수 있다.

[0280] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, LF의 PA 결합 도메인은 LF의 N 말단 도메인(LFPABD 또는 LFn이라 축약됨)이다.

[0281] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, EF의 PA 결합 도메인은 EF의 N 말단 도메인(EFPABD 또는 EFn이라 축약됨)이다.

[0282] LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 이를 융합 단백질은 비융합된 PA와 함께 사용되거나 투여되거나, (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 제2 융합 단백질(여기서, PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 통각수용체 뉴런으로 지시함)과 함께 사용되거나 투여된다. 즉, 일 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 비융합된 또는 네이티브 PA와 동시 투여된다. 또 다른 실시형태에서, LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 통증을 치료하도록 대상체에게 제2 융합 단백질과 동시 투여된다. 제2 융합 단백질은 (a) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편 및 (b) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하고, 여기서 PA 또는 PA 단편은 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 융합되고, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통증을 치료하도록 독소를 함유하는 제1 융합 단백질을 통각수용체 뉴런으로 지시한다. 제2 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, PA는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTXR2 수용체에 결합하지 않는 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 변이체 형태(mPA)이다.

[0283] 일 양태에서,

[0284] (I) (a) 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)을 포함하는 제1 융합 단백질, 및

[0285] (II) (c) LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 또는 PA 단편, 및 임의로 (d) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 제2 단백질(여기서, 파트 (a) 및 (b)는 웨타이드 링커에 의해 연결되고, 파트 (c) 및 (d)는 또한 웨타이드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 조성물이 본 명세서에 기재되어 있다. 기재된 조성물의 일 실시형태에서, 제2 단백질이 융합 단백질일 때, PA는 mPA인 PA의 돌연변이체 변이체이다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0286] 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. LFn 또는 EFn에 결합할 수 있는 PA 단편의 비제한적인 예는 PA63이다. 본 명세서에 기재된 조성물의 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 본 명세서에 기재된 조성물의 일 실시형태에서, PA는 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질이다. 본 명

세서에 기재된 조성물의 일 실시형태에서, PA는 융합 단백질에 결합될 수 있는 올리고머 PA이다. 일 실시형태에서, 이러한 조성물은 통증, 예컨대 신경, 관절, 피부, 내장, 방광, 또는 근육 통증, 및 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애의 치료에 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 이 조성물은 통증의 치료를 위한 약제의 제조에 유용하다.

[0287] **다이설파이드 함유 웨타이드 독소-PAd4/PA 융합 단백질**

일 양태에서, (a) 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4); 또는 (b) (iii) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. (도 9 참조) 일 실시형태에서, (a) 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 및 (b) (i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 (b) (ii) 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4); 또는 (b) (iii) 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 융합 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다. 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 파트 (a)는 링커 웨타이드에 의해 파트 (b)에 융합된다. 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 융합 단백질의 N 말단에 위치한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 융합 단백질의 C 말단에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, PA, PAd4 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 융합 단백질의 N 말단 및 C 말단 둘 다에 위치하여서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 2개의 PA, PAd4 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질에 의해 샌드위칭된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 저해제 시스테인 노트 독소(ICK) 독소이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 델타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II(PE) 독소이다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 PA, PAd4 또는 통각수용체 결합 단백질 및 저해제 시스테인 노트 독소 사이에 링커 웨타이드를 포함한다.

또 다른 양태에서, (a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(TM)를 포함하는 융합 단백질(여기서, 통각수용체 뉴런은 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 발현함)이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소이다. 또 다른 실시형태에서, (a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(TM)를 포함하는 융합 단백질(여기서, 통각수용체 뉴런은 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 발현함)을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0289] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함할 수 있다.

[0290] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 예를 들어 코노톡신, 아가톡신, 델타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소일 수 있다.

[0291] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, TM은 예를 들어 (i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA); (ii) PA의 C 말단 수용체 결합 도메인; 또는 (iii) 이의 PA 단편, 예를 들어 PAd4; 또는 (iv) 통각수용체 뉴런 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0292] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 각각의 일 실시형태에서, TM, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인, 또는 PA 단편 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 통각수용체 뉴런에서 발현된 ANTXR2(CMG2) 수용체에 결합할 수 있다. 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 ANTXR2 수용체에 특이적으로 결합하는 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 ANTXR2 수용체에 결합할 수 있는 항체 단편이다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 NGF 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된다.

[0293] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, PA는 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같고 당해 분야에 공지된 퓨린 절단에 저항성인 돌연변이체 PA일 수 있다. 예를 들어, 아미노산 잔기 RKKR을 포

함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 내성 아미노산 서열, 예컨대 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)에 의해 대체될 수 있다. RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웹타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기이다.

[0295] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 예를 들어 PA63 또는 PAd4일 수 있다.

[0296] 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 모든 상기 양태 및 실시형태에서, PAd4, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 예를 들어 프로테아제에 의한 절단에 저항성으로 변형되거나 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웹타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 Lys 잔기의 하나 이상, 이것 이하 및 이것 포함은 예를 들어 Arg 또는 His에 의해 대체될 수 있다. 즉, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PA의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기의 하나 이상, 이것 이하 및 이것 포함은 예를 들어 Arg 또는 His에 의해 대체될 수 있다. PAd4, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인이 내성이도록 만들어질 수 있는 프로테아제의 다른 예는 라이실 웹타이드, 트립신, 엔테로키나제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 키모트립신, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

(mPA-통각수용체 결합 단백질) 융합 단백질

[0298] 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널을 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합되도록, 예를 들어 미국 특허 출원 공보 제20150044210호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 바대로, 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록, (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 변이체 PA인 mPA의 조작이 본 명세서에 추가로 기재되어 있다. 따라서, 일 양태에서, 조작된 융합 단백질은 (a) 조작 mPA 및 (b) 통각수용체 결합 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, (a) 조작 mPA 및 (b) 통각수용체 결합 단백질을 포함하는, 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 예로서, 통각수용체 결합 단백질은 통각수용체에서 ANTRAX 수용체에 결합할 수 있는 비-PA 단백질, 또는 통각수용체의 세포 표면 상의 수용체 또는 이온 채널 단백질, 또는 통각수용체의 세포 표면 상의 수용체의 단백질 리간드에 결합하는 항체일 수 있다. 기재된 조작된 융합 단백질의 예로서, mPA는 NGF 수용체를 표적화하고 이에 결합하도록 NGF에 융합될 수 있거나, mPA는 통각수용체 상의 나트륨 이온 기공을 생성하는 Nav1.7 채널에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편에 융합될 수 있다. Nav1.7은 배근 신경절(DRG) 및 삼차 신경절에서의 통각수용(통증) 뉴런 및 자율(불수의) 신경계의 일부인 교감 신경절 뉴런의 2개의 유형의 뉴런에서 보통 높은 수준으로 발현된다. 통각수용체 결합 단백질에 융합된 mPA를 포함하는 이러한 융합 단백질이 LFn 또는 EFn 또는 EF 또는 LF, 예를 들어 BTx에 융합된 LFn, 또는 TTx에 융합된 LFn, 또는 BTx에 융합된 EFn, 또는 TTx에 융합된 EFn을 포함하는 또 다른 융합 단백질과 함께 사용될 때, 및 제1 융합 단백질과 제2 융합 단백질 사이에 mPA/LFn 또는 EFn 상호작용이 발생할 때, 독소는 융합 단백질의 통각수용체 결합 단백질에 의해 통각수용체로 특이적으로 지시되고, 독소는 mPA/LFn 또는 EFn 상호작용에 의해 시토졸로 진입한다.

[0299] LF 또는 EF와 조합되어 통각수용체 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자와 융합된, 네이티브 PA 또는 돌연변이체 PA(mPA, 차단된 이의 네이티브 수용체 결합 기능을 가지는, (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된 변이체 PA를 나타냄)가 본 명세서에 또한 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 통각수용체 결합 단백질에 융합된 mPA를 포함하는 융합 단백질은 LF 또는 EF와 함께 특이적으로 사용된다. MAP 키나제 및 이의 신호전달 경로는 마우스 모델에서 만성 통증 발생에 중요한 것으로 밝혀졌다. LF는 MAP 키나제 신호전달을 특이적으로 저해한다. 일 실시형태에서, LF와 조합된 PA 또는 mPA는 통증을 차단하도록 통각수용체에서 MAP 키나제 신호전달을 특이적으로 표적화하도록 사용될 수 있다. EF는 아데닐레이트 시클라아제를 활성화하고, 이것은 통증 발생에 또한 연결된다. EF와 조합된 PA 또는 mPA를 사용함으로써 통증에서 아데닐레이트 시클라아제를 또한 표적화할 수 있다.

[0300] Nav1.8 및 Nav1.9는 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 단백질의 통각수용체 결합 단백질에 대한 표적 수용체로서 또한 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질의 다른 실시형태에서, 융합 단백질의 통각수용체 결합 단백질 파트는 Nav1.8 또는 Nav1.9에 결합한다.

[0301] LFn 또는 EFn, 또는 LF 또는 EF를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 임의의 상기 양태 및 실시형태에서, 및 PA 또는 PA 단편을 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 실시형태에서, 단백질분해로 활성화된 PA(예를 들어, PA63) 또는 mPA로부터 형성된 PA의 올리고며 형태는 수용

체 보유 세포에 대한 결합활성을 증가시키도록 단량체 PA에 치환될 수 있다. 독소 이펙터 모이어티는 투여되기 전에 PA 올리고머 형태에 결합하거나, 별개로 주사될 수 있다.

[0302] 또 다른 양태에서,

[0303] i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티; 또는

[0304] ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 포함하는 제1 도메인; 및

[0305] iii) 탄저병 독소 전위 펩타이드와 임의로 융합된 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx));

[0306] iv) 탄저병 독소 전위 펩타이드와 임의로 융합된 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인; 또는

[0307] v) 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 포함하는 제2 도메인을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0308] 일 실시형태에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 링커 펩타이드에 의해 함께 융합된다. 일 실시형태에서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 또 다른 실시형태에서, 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청 중에 안정하다.

[0309] 또 다른 실시형태에서, 융합 단백질의 제1 도메인은 융합 단백질의 표적화 모이어티(TM)로서 작용한다. 표적화 모이어티는 통각수용체에서 농후화된 세포 표면 마커를 통해 독소를 통각수용체 뉴런으로 지시하도록 작용한다. 비제한적인 예는 통각수용체의 표면에서 발현된 풍부한 ANTXR2 수용체, NGF 수용체, 및/또는 Nav1.7, Nav1.8, 또는 Nav1.9 이온 채널을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일 실시형태에서, 표적화 모이어티는 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 것이고, 결합 부위는 통각수용체 뉴런 내의 엔도솜으로 흡입되는 내포작용을 겪을 수 있고, 통각수용체 뉴런은 SNARE 단백질을 발현하고, 이것은 후속하여 제2 도메인의 독소에 의해 단백질분해로 절단된다. 또 다른 실시형태에서, 표적화 모이어티는 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 것이고, 통각수용체 뉴런은 나트륨 또는 칼슘, 또는 나트륨 및 칼슘 둘 다, 이온 채널(예를 들어, Nav1.7, Nav1.8 및 Nav1.9 이온 채널)을 발현하거나, ANTXR2 수용체 또는 NGF 수용체를 발현한다. 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위는 따라서 ANTXR2 수용체, NGF 수용체, Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9 이온 채널이다.

[0310] 통각수용체 표면 수용체, 예컨대 ANTXR2, 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자는 예를 들어 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 압타미), 폴리펩타이드, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 아피바디일 수 있다. 아피바디 분자는 높은 친화도로 다수의 표적 단백질 또는 펩타이드에 결합하도록 조작된 작은 단백질이어서, 단일클론 항체를 모방하고, 따라서 항체 모방체의 패밀리의 구성원이다. 몇몇 실시형태에서, 분자는 항체 시약, 예를 들어 항체, 단일클론 항체, 및/또는 이의 항원-결합 부분일 수 있다. 통각수용체 표면 수용체 및/또는 통각수용체 이온 채널 수용체는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Gohar. Modulator 2005 19:9-13; Bennaroch. Neurology 2015 10; Simon et al. The Nociceptive Membrane. Academic Press 2011](이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 통각수용체 표면 수용체 및/또는 통각수용체 이온 채널 수용체의 비제한적인 예는 예를 들어 NGF 수용체 (NGFR)(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 4804) Nav1.7(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 6335), Nav1.8(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 6336) 또는 Nav1.9(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 11280)를 포함한다. 본원에서 및 서열 기준 번호에 의해 본 명세서에 걸쳐 언급되는 모든 데이터베이스 서열은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다. 데이터베이스 기준 번호 및 서열은 본원의 출원일에 데이터베이스에 기재된 바와 같다. 통각수용체 표면 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자를 수반하는 임의의 양태의 일 실시형태에서, 분자는 NGF 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 시약 및/또는 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체 시약일 수 있다. 임의의 이러한 양태의 몇몇 실시형태에서, 오프 타깃 효과를 감소시키기 위해, 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 다수의 분자는 동일한 융합 단백질 및/또는 조성물에 존재할 수 있다. 조성물은 상이한 표적화 모이어티를 가지는 2개, 3개 또는 이것 초과의 융합 단백질을 또한 포함할 수 있다.

[0311] PA 폴리펩타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, ANTXR2에 특이적으로 결합하는 PA의 능력을 사용하지 않으면서 표적화되도록 PA의 기공 형성 능력이 원해진다. 따라서, PA 폴리펩타이드를 수반하는 임의의 양태의 일 실시형태에서, 조성물은, 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된, 네이티브 ANTXR2-결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독

소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, PA의 PAd4 도메인은 수용체 결합 기능을 차단하도록 결실되고/되거나 변경될 수 있다. 추가의 비제한적인 예로서, mPA는 (aa 1-29 잔기에서의 신호 웹타이드의 제거 후 서열 번호 1의 서열에 대해) N682A 및/또는 D683A를 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Rosovitz MJ, et al. 2003. Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen (PAd4) reveal residues important for binding to cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody. J. Biol. Chem. 278:30936-30944](본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨) 참조). 원하는 돌연변이를 포함하도록 폴리웹타이드 서열을 변경하고/하거나 단백질을 조작하는 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있고, 이의 예는 본 명세서에서 그 외 기재되어 있다.

[0312] 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질의 제2 도메인은 융합 단백질의 독소 이펙터 모이어티이다. 독소 단백질에 따라, 독소 이펙터 모이어티는 통각수용체에서의 세포 신호전달을 파괴하고/하거나, 통각수용체로부터의 신경전달물질의 방출을 차단하거나 통각수용체를 살해하도록 작용한다. 독소 이펙터 모이어티는 소포에서의 하나 이상의 SNARE 단백질(예를 들어, BTx 및 TTx), MAP 키나제(EF 및 LF) 등을 표적화하는 비세포독성 프로테아제일 수 있다.

[0313] 본 명세서에 기재된 바대로, 본 발명자들은 탄저병 보호성 항원이 통각수용체 뉴런을 선택적으로 표적화하여 이들에 결합하고 막 수송할 수 있는 기공을 형성할 수 있다는 것을 발견하였다. 탄저병 독소 보호성 항원 및 적절한 독소를 (물리적으로 또는 기능적으로) 커플링함으로써, 통각수용체 뉴런은 살해되고/되거나 불능될 수 있거나, 통증 신호는 차단될 수 있다. 이러한 조성물은, 신경계의 나머지에 실질적인 오프 타깃 효과 없이, 예를 들어 통각수용체 뉴런에서 세포 신호전달 또는 시냅스 전달을 불능시킴으로써 예를 들어 통증을 치료하도록 사용될 수 있다. 더구나, 이 시스템의 사용은 물질 남용의 쇠약한 부작용 없이 통증 치료를 허용한다.

[0314] 소정의 양태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질은 독소를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "독소"는 독소에 의해 제시되는 숙주 세포에서의 유독한, 독이 있는 또는 해로운 효과의 발생을 야기하거나 증가시키는 유기체에 의해 생성된 화합물을 의미한다. 이러한 해로운 상태는 중요한 세포 기능의 저해, 세포 대사의 저해, 및/또는 세포사를 포함할 수 있다.

[0315] 독소를 수반하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 독소는 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소, 예를 들어 코노톡신(CTx)일 수 있다.

[0316] 독소를 수반하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 독소는 세포내로 작용하는 독소 및/또는 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인일 수 있다. 적합한 박테리아 독소는 예를 들어 신경전달물질 방출을 방지하기 위한 SNARE 단백질에 대해 단백질분해 활성을 가지는 것, 또는 뉴런에 세포독성인 독소를 포함할 수 있다. 적합한 독소의 비제한적인 예는 박테리아 독소, 예컨대, 예를 들어 디프테리아 독소(DTx)(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 2650491; 서열 번호 2); 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx 또는 PE)(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 877850; 서열 번호 3); 보툴리눔 독소(BTx)(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 5398487; 서열 번호 4); 과상풍 독소(TTx)(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 17583237; 서열 번호 5) 쇠가 독소(예를 들어, Shigella Stx(예를 들어, 유전자은행 수탁 번호 CAC05622 및 CAC05623) Stx-1(예를 들어, 유전자은행 수탁 번호 32400300 및 32400299) 및/또는 Stx-2(예를 들어, 유전자은행 수탁 번호 161511882 및 161511883), 탄저병 치사 독소(치사인자), 및/또는 탄저병 부종 독소(부종 인자)를 포함할 수 있다. 적합한 독소의 추가의 비제한적인 예는 리신 독소(예를 들어, NCBI 유전자 번호: 8287993)이다.

[0317] 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 독소는 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)일 수 있다.

[0318] 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 다수의 독소는 본 명세서에 기재된 바와 같은 동일한 융합 단백질 및/또는 조성물에 존재할 수 있다.

[0319] 몇몇 실시형태에서, 이펙터 모이어티는 내부에 전위 도메인(TL)을 포함하는 독소를 포함한다. 일 실시형태에서, TL은 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토솔로 융합 단백질을 전위시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, TL은 본 명세서에서 탄저병 독소 전위 웹타이드라 또한 칭해지는 탄저병 전위 신호 웹타이드 (LFn 또는 EFn), BTx의 H_N 도메인(혈청형 포함됨) 또는 TTx의 H_N 도메인, 또는 다중양이온성 서열, 예컨대 KKK, KKKKKK(서열 번호 59), KKKKKKKK(서열 번호 60), HHH, HHHHHH(서열 번호 61), HHHHHHHH(서열 번호 62), RRR, RRRRRR(서열 번호 63), 또는 RRRRRRRR(서열 번호 64)이다. US 특허 출원 공보 US 제2003/0202989호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)를 참조한다. 다른 실시형태에서, TL은 클로스트리듐 신경독소(CNT) 패밀리 구성원

단백질로부터 유래한 H_N 인 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인이다. 이것은 BTx 혈청형, TTx 및 새로 발견된 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소를 포함한다.

[0320] 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 독소는, 예를 들어 PA 및/또는 mPA가 독소를 인식하고 이를 통각수용체 세포로 수송하게 하도록, 탄저병 독소 전위 웨타이드와 융합될 수 있다.

[0321] 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 전위 도메인은 다중양이온성 서열일 수 있다. 이러한 서열은 당해 분야에 논의되어 있고; 예를 들어 문헌[Blanke, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pp. 8437-8442, 1996] 및 미국 특허 출원 공보 US 제2003/0202989호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)를 참조한다. 다중양이온성 서열은 적어도 2개의 양이온성 아미노산, 예를 들어 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘을 포함할 수 있다. 전위 기능에 다중양이온성 서열을 사용하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 다중양이온성 서열은 적어도 약 3개, 약 6개 또는 약 8개의 양이온성 아미노산을 포함할 수 있다. 전위 기능에 다중양이온성 서열을 사용하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 다중양이온성 서열은 서열 KKK, KKKKK(서열 번호 59) 또는 KKKKKKK(서열 번호 60)를 포함할 수 있다. 전위 기능에 다중양이온성 서열을 사용하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 다중양이온성 서열은 서열 HHH, HHHHHH(서열 번호 61) 또는 HHHHHHHH(서열 번호 62)를 포함할 수 있다. 전위 기능에 다중양이온성 서열을 사용하는 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 다중양이온성 서열은 서열 RRR, RRRRR(서열 번호 63) 또는 RRRRRRR(서열 번호 64)을 포함할 수 있다.

[0322] 본 명세서에 기재된 바와 같은 독소 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 제1 융합 단백질 도메인은 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질 도메인은 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 전위 웨타이드를 포함한다. 제1 융합 단백질 도메인의 다른 실시형태에서, 탄저병 독소 전위 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인, H_N 또는 다중양이온성 서열에 의해 대체된다.

[0323] 본 명세서에 기재된 바와 같은 독소 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 제1 도메인은, 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하고, 제2 도메인은 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인과 융합된 탄저병 독소 전위 웨타이드를 포함한다. 제1 융합 단백질 도메인의 다른 실시형태에서, 탄저병 독소 전위 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인, H_N 또는 다중양이온성 서열에 의해 대체된다.

[0324] 본 명세서에 기재된 바와 같은 독소 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 제1 도메인은 i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티; 또는 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하고; 제2 도메인은 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)를 포함한다.

[0325] 또 다른 양태에서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는, 조작된 융합 단백질이 본 명세서에 기재되어 있다. 기능성 기공을 형성하기 위해, PA 및/또는 mPA는 올리고머화해야 한다. 따라서, PA 폴리웨타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태일 수 있다. PA 폴리웨타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 몇몇 실시형태에서, PA 또는 mPA는 대상체에 대한 투여 전에 및/또는 통각수용체 세포와 접촉하기 전에 올리고머 형태일 수 있다.

링커

[0327] 링커는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리웨타이드의 2개 이상의 도메인 또는 부분을 연결하도록 사용될 수 있다. 링커 분자("링커")는 1개 내지 다수의 아미노산으로 이루어진 웨타이드 또는 비웨타이드 분자일 수 있다. 본 명세서에 기재된 폴리웨타이드에서 유용한 웨타이드 링커 분자의 예는 글라이신 농후 웨타이드 링커(예를 들어 US 제5,908,626호 참조)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기의 절반 초과는 글라이신이다. 바람직하게는, 이러한 글라이신 농후 웨타이드 링커는 약 20개 또는 이것 미만의 아미노산으로 이루어진다.

[0328] 링커 분자는 또한 비웨타이드 또는 부분 웨타이드 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 웨타이드는 널리 공지된 가교결합 분자, 예컨대 글루타르알데하이드 또는 EDC를 사용하여 웨타이드 또는 다른 분자에 연결될 수 있다(Pierce(일리노이주 략포드)).

[0329] 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 몇몇 실시형태에서, 다양한 도메인 및 모이어티, TM, TL, PAd4, PA 단편,

LF, LFn, EF, EFn, mPA, 다양한 유형의 독소(BTx, 예컨대 다양한 혈청형, TTx, AB 독소, 리신 독소, 콜레라 독소, PE, 쉬가 독소, DT, 코노톡신, 아가톡신, 델타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소) 등은 링커 웨타이드에 의해 각각의 융합 단백질에서 함께 연결된다. 링커 웨타이드의 예는 FHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 65); VEIEDTE(서열 번호 66), KDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 67); STEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 68), EVKQENRLLNESES(서열 번호 69); 및 VGADESVVKEAHREVINSSTEGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTE(서열 번호 70)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0330] 가요성 링커는 일반적으로 작은, 비극성 또는 극성 잔기, 예컨대 Gly, Ser 및 Thr로 이루어진다. 링커를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 링커를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커는 1개 내지 25개의 잔기 길이인 가요성 폴리웨타이드이다. 가요성 웨타이드 링커의 일반 예는 (GGS)_n(식 중, n = 1 내지 8), 또는 (Gly4Ser)_n 반복(식 중, n = 1-8(서열 번호 57), 바람직하게는, n=3, 4, 5, 또는 6임), 즉 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n(식 중, n은 반복 모티프의 수를 나타냄)을 포함한다. 예를 들어, 가요성 링커는 (GGS)₂, GGSGGS(서열 번호 58)이다.
- [0331] 링커를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청 중에 안정하다. 일 실시형태에서, 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는다.
- [0332] 링커 및 PAd4를 포함하는 융합 단백질의 일 실시형태에서, PAd4의 N 말단에 부착된 링커는 20개 미만의 아미노산 길이이고, 적어도 3개의 아미노산 Gly, Ser 및 Ala로 이루어진다.
- [0333] 링커 및 PAd4를 포함하는 융합 단백질의 일 실시형태에서, PAd4의 N 말단에 부착된 링커는 20개 미만의 아미노산 길이이고, 적어도 4개의 아미노산 Gly, Ser, Thr 및 Ala로 이루어진다.
- [0334] 링커를 포함하는 융합 단백질의 일 실시형태에서, 링커는 적어도 1분 동안 인간 혈청 중에 안정하고, 20개 미만의 아미노산 길이이다.
- [0335] 이작용성 가교결합 분자는 2개의 구별되는 반응 부위를 보유하는 링커 분자이다. 예를 들어, 이작용성 링커 분자의 반응 부위 중 하나는 공유 연결을 형성하도록 웨타이드 상의 작용기와 반응할 수 있고, 다른 반응 부위는 공유 연결을 형성하도록 또 다른 분자 상의 작용기와 반응할 수 있다. 가교결합 분자에 대한 일반 방법은 검토되어 있다(예를 들어, 문헌[Means and Feeney, Bioconjugate Chem., 1: 2-12 (1990)] 참조).
- [0336] 동종이작용성 가교결합체 분자는 화학적으로 동일한 2개의 반응 부위를 가진다. 동종이작용성 가교결합체 분자의 예는, 제한 없이, 글루타르알데하이드; N,N'-비스(3-말레이미도-프로파오닐-2-하이드록시-1,3-프로판다이올(설프하이드릴 특이적 동종이작용성 가교결합체); 소정의 N-숙신이미드 에스터(예를 들어, 다이숙시니미딜 수베레이트, 다이티오비스(숙신이미딜 프로파오네이트), 및 가용성 비스-설폰산 및 이의 염을 포함한다(예를 들어, 문헌[Pierce Chemicals(일리노이주 랙포드); Sigma-Aldrich Corp.(미주리주 세인트 루이스)] 참조).
- [0337] 바람직하게는, 이작용성 가교결합체 분자는 이종이작용성 링커 분자이고, 이는 링커가 적어도 2개의 상이한 반응 부위(이들의 각각은 웨타이드 또는 다른 분자에 별개로 연결될 수 있음)를 가진다는 것을 의미한다. 이러한 이종이작용성 링커의 사용은 선택된 웨타이드 서열에 대한 각각의 반응 부위의 화학적으로 별개의 및 단계별 첨가(벡터 접합)를 허용한다. 본 발명에서 유용한 이종이작용성 링커 분자는, 제한 없이, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터(문헌[Green et al., Cell, 28: 477-487 (1982); Palker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84: 2479-2483 (1987)] 참조); m-말레이미도-벤조일설포숙신이미드 에스터; 말레이미도뷰티르산 N-하이드록시숙신이미드 에스터; 및 N-숙신이미딜 3-(2-페리딜-다이티오)프로파오네이트(예를 들어, 문헌[Carlos et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978); Sigma-Aldrich Corp.(미주리주 세인트 루이스)] 참조)를 포함한다.
- [0338] **PAd4 도메인** - 본 명세서에 기재된 PAd4 도메인을 포함하는 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 텐덤으로 약 2개 내지 10개의 PAd4 도메인, 또는 텐덤으로 1개 내지 5개의 PAd4 도메인, 또는 2개 내지 5개의 PAd4 도메인 등을 포함한다. 융합 단백질의 일 실시형태에서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 PA의 N 말단 측으로부터의 대략 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 독소 모이어티(예를 들어, BTx 모이어티, TTx 모이어티, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소 모이어티, AB 독소 모이어티 등과 PAd4 도메인(들) 사이에 추가로 혼입된다.

- [0339] 본 명세서에 기재된 PAd4 도메인을 포함하는 융합 단백질 또는 PAd4 도메인을 포함하는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 PA의 도메인 2(PAd2)를 추가로 포함한다. PAd2 도메인은 PA 서열의 259-487번 아미노산 잔기(서열 번호 1)에서 발견될 수 있다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 또는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 PA의 PAd2 및 PAd4 도메인을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 예를 들어, 융합 단백질은 PA의 259-487번 및 488-764번 잔기(서열 번호 1)를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.
- [0340] 본 명세서에 기재된 PAd4 도메인을 포함하는 융합 단백질 또는 PAd4 도메인을 포함하는 조성물의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 온전한 PA의 변이체 형태(여기서, 퓨린 절단 부위는 돌연변이(M)에 의해 제거되어서, PA는 단백질분해 활성화에 내성이고, 그러므로 올리고머화하지 않음)를 추가로 포함한다.
- [0341] 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTXR2에 결합하는 PA, 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ANTXR2에 결합하는 PA, 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 조성물, ANTXR2에 결합하는 PA 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인의 일 실시형태에서, PA 유래 단백질은 변형되거나 돌연변이된다.
- [0342] 일 실시형태에서, ANTXR2에 결합하는 PAd4, PA 또는 이의 PA 단편, 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 프로테아제, 예컨대 Lys C에 의한 절단에 저항성이다. PA가 내성하게 될 수 있는 프로테아제의 다른 예는 라이실펩타이드, 트립신, 엔테로카니제, 클로스트리파인, 엘라스타제, 서몰리신, 엔도단백분해효소 Lys-C 및 엔도단백분해효소 Arg-C를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0343] PAd4 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 하나 이상의 Lys 잔기는 Arg 또는 His에 의해 대체되고, 여기서 넘버링은 서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웹타이드를 뺀 후 서열 번호 1의 것을 의미한다. 이것은 PA의 임의의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함한다.
- [0344] PAd4 도메인을 포함하는 것으로 기재된 임의의 융합 단백질의 일 실시형태에서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 하나 이상의 Lys 잔기는 예를 들어 Arg 또는 His에 의해 대체된다.
- [0345] 일 실시형태에서, 서열 번호 1의 630번, 742번, 및/또는 748번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 하나 이상의 Asn 잔기는 Asp에 의해 대체된다.
- [0346] PA 본 명세서에 기재된 도메인을 포함하는 PA 융합 단백질 또는 이러한 융합 단백질을 포함하는 조성물의 일 실시형태에서, PA는 퓨린 절단에 저항성인 PA의 변이체 또는 돌연변이체 형태(PA^{퓨린-})이거나, 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 돌연변이된다(mPA). 일 실시형태에서, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 PA 퓨린 절단 부위는 퓨린 내성 아미노산 서열에 의해 대체된다. RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웹타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기이다. 일 실시형태에서, 퓨린 내성 아미노산 서열은 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)이다. 일 실시형태에서, PA는 PA의 수용체 결합 기능을 차단하는 N711A 및/또는 D712A인 1개 또는 2개의 돌연변이를 가지고, 아미노산 넘버링은 서열 번호 1에 따르고, 전체 PA는 29개의 잔기 신호 웹타이드를 포함한다. 2개의 돌연변이는 29개의 잔기 신호 웹타이드 없이 넘버링된 PA 서열에서의 N682A/D683A이다.
- [0347] PA를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, PA는, 예를 들어 프로테아제, 예컨대 Lys-C 또는 퓨린에 의해 절단에 저항성이도록, 변형되거나 돌연변이된다. 예를 들어, 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PA의 PAd4 도메인에서의 하나 이상의 Lys 잔기는 Arg 또는 His에 의해 대체될 수 있다. (N 말단의 제거 후 서열 번호 1, 29개의 aa 신호 웹타이드) (이 서열은 29개의 aa 신호 웹타이드를 가지는 P13423임). 즉, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PA의 PAd4 도메인에서의 각각의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이것 이하 및 이것 포함은 예를 들어 Arg 또는 His에 의해 대체될 수 있다.
- [0348] 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함한다.

- [0349] 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 글라이코실화된다.
- [0350] *
- [0351] *본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 융합 단백질은 비글라이코실화된다.
- [0352] **조작된 융합 단백질의 제조**
- [0353] 본 명세서에 기재된 다양한 폴리펩타이드(예를 들어, 융합 폴리펩타이드 또는 제1 또는 제2 폴리펩타이드)는 천연 소스로부터 정제되고/되거나, 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 재조합으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질은 당해 분야에 공지된 재조합 분자 클로닝에 의해 제조될 수 있다. 비제한적인 예로서, PA는 비. 안트라시스의 스턴(Sterne) 균주로부터 정제되거나 다른 공지된 수단에 의해 합성될 수 있다. 비. 안트라시스에서, PA에 대한 유전자는 pXO1이라 칭하는 플라스미드에 위치한다(Milne et al., 1994, *J. of Biol. Chem.* 269(32):20607-20612; 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨). 재조합 발현의 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 몇몇 실시형태에서, PA63은 전장 PA에 대해 치환될 수 있다. PA63 단편은 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 트립신 처리된 PA로부터 정제될 수 있다(상기 문헌[Milne et al., 1994]). 유전자를 코딩하는 PA는 클로닝되고 서열분석되고(Vodkin, et al., 1983, *Cell* 34:693-697; 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨), 정제된 PA 폴리펩타이드를 얻도록 사용될 수 있다.
- [0354] 2개의 폴리펩타이드 모이어티의 융합은 재조합 DNA 기법에 의해, 또는 소르타제 반응(예를 들어, WO 제 2012096926호, WO 제2013177231호, WO 제2014088928호; US 특허 제9079952호, 및 US 특허 출원 공보 US 제 2013/0336974호 및 US 제2015/0267186호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨) 참조), 또는 당해 분야에 공지된 화학적 연결/생화학적 접합의 다른 방법을 이용하여 실행된다.
- [0355] 기재된 조작된 융합 단백질을 제조하도록 재조합 DNA 및 분자 생물학 기법을 이용할 수 있다. TM, TL, PAd4, PA 단편, LF, LFn, EF, EFn, mPA, 다양한 유형의 독소(BTx, TTx, AB 독소, 리신 독소, 콜레라 독소, PE, 쉬가 독소, DT, 코노톡신, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소) 등과 같은 각각의 단백질 도메인 및 모이어티를 코딩하는 cDNA 분절 및 서열을 클로닝하는 공정, 다양한 펩타이드 링커를 코딩하는 DNA 서열의 제조, 상이한 cDNA 서열의 결찰, 다양한 조작된 융합 단백질을 위한 발현 벡터(예를 들어, 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드 또는 바이러스 벡터)의 작제, 및 단백질 발현 및 다양한 재조합 조작된 융합 단백질의 정제는 예컨대 문헌[Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA(2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA(2012) (ISBN 044460149X); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005](이들은 모두 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 종래의 재조합 분자 생물학 및 단백질 생화학 기법에 의해 수행될 수 있다.
- [0356] 조작된 융합 단백질 및 펩타이드 링커는 융합 단백질의 합성을 위한 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 특히 화학적 합성 또는 재조합 발현 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0357] 본 발명의 조작된 융합 단백질은 재조합 단백질의 발현 및 정제에 대해 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0358] 조작된 융합 단백질의 재조합 발현은 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 작제를 요한다. 폴리뉴클레오타이드는 추가로 단백질 정제 또는 발현 시스템에서 또는 단백질 정제 과정 동안 조작된 융합 단백질을 확인하거나 위치시키는 것의 목적을 위해 추가 아미노산을 코딩하는 서열일 수 있다. 조작된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 얻어지면, 융합 단백질의 제조를 위한 벡터는 당해 분야에 널리 공지된 기법을 이용하여 재조합 DNA 기법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 융합 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법은 본 명세서에 기재되어 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법은 단백질 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 작제하도록 사용될 수 있다. 이들 방법은 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체내 유전적 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동적으로 연결된 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 제공한다. 발현 벡터는 종래의 기법에 의해 숙주 세포로 전달되고, 전달된 세포는 이후 본 발명의 조작된 융합 단백질을 제조하기 위한 종래의 기법에

의해 배양된다. 따라서, 본 발명은 비상동성 프로모터에 작동적으로 연결된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 포함한다.

[0359] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본 발명의 융합 단백질을 발현하도록 사용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 있는 코딩 서열이 제조되고 후속하여 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열에 의해 형질변환 또는 형질감염될 때, 또한 본 발명의 융합 단백질을 인시츄로 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은 미생물, 예컨대 융합 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터에 의해 형질변환된 원핵생물 박테리아(예를 들어, 약독화된 바실러스 안트라시스 균주, 이. 콜라이, 비. 서브틸리스); 융합 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터에 의해 형질변환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스, 피치아); 융합 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바클로바이러스)에 의해 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 의해 감염되거나 융합 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)에 의해 형질변환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포의 계놈으로부터 유래한 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래한 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 작제물을 보유하는 포유류 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 박테리아 세포, 예컨대 이. 콜라이 및 약독화된 비. 안트라시스 균주는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 발현에 특히 유용하다.

[0360] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 융합 단백질에 의도되는 사용에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단백질의 많은 분량이 생성될 때, 융합 단백질의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물의 높은 수준의 발현을 지시하는 벡터가 요망될 수 있다. 이러한 벡터는 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., EMBO J., 2:1791 (1983))(여기서, 융합 단백질 코딩 서열은 융합 단백질이 생성되도록 lacZ 코딩 영역과 인프레임으로 벡터로 개별적으로 결찰될 수 있음); pIN 벡터(Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989))를 포함하지만 이들로 제한되지는 않고; 유사한 pGEX 벡터는 글루타티온 S-전환효소(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩타이드를 발현하도록 또한 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 기질 글루타티온-아가로스 비드에 대한 흡착 및 결합에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제된 후, 유리 글루타티온의 존재 하에 용리될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계될 수 있어서, 클로닝된 표적 유전자 생성물은 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다. 대안적으로, pET 발현 벡터는 히스티딘 태그화 재조합 단백질을 제조하도록 사용될 수 있고, 여기서 히스티딘 태그화 재조합 단백질은 니켈 칼럼에 의해 친화도 정제될 수 있다. 피치아 파스토리스에서의 재조합 단백질의 발현은 문헌[Holliger, P. (2002) *Meth. Mol. Biol.*, 178:349-57](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 조작된 탄저병 함유 융합 단백질 및 BTx 또는 TTx 함유 융합 단백질의 재조합 발현 및 정제의 예는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 국제 특허 공보 WO 제2012/096926호 및 WO 제2015/166242호; 미국 특허 제9079952호, 제9234011호, 제9243301호 및 미국 특허 출원 공보 US 제2013/0336974호, US 제2015/0267186호, US 제2015/0044210호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 더 자세히 기재되어 있다.

[0361] 곤충 시스템에서, 아우토그라파 칼리포르니카 핵 다각체병 바이러스(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: AcNPV)는 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포돕테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 융합 단백질 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)으로 개별적으로 클로닝되고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 위치할 수 있다.

[0362] 조류 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에서의 비상동성 단백질의 대규모 발현은 문헌 [Griesbeck C. et. al. 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33; Manuell AL et. al. 2007 Plant Biotechnol J. Eprint; Franklin SE and Mayfield SP, 2005, Expert Opin Biol Ther. Feb;5(2):225-35; Mayfield SP and Franklin SE, 2005 Vaccine Mar 7:23(15):1828-32; 및 Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5]에 의해 기재되어 있다. 외래 비상동성 코딩 서열은 상동성 재조합에 의해 핵, 엽록체 및 미토콘드리아의 계놈으로 삽입된다. 스펙티노마이신 또는 스트렙토마이신에 대한 내성을 부여하는, 대부분의 범용 엽록체 선택 가능한 마커 아미노글라이코사이드 아데닐 전환효소(aadA)를 보유하는 엽록체 발현 벡터 p64는 엽록체에서 외래 단백질을 발현하도록 사용될 수 있다. 유전자충격 유전자 총 방법은 조류에서 벡터를 도입하도록 사용된다. 엽록체로의 이의 진입 시, 외래 DNA는 유전자 총 입자로부터 방출되고, 상동성 재조합을 통해 엽록체 계놈으로 통합한다.

[0363]

포유류 숙주 세포에서, 다수의 바이러스 기반 발현 시스템을 사용할 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우에, 융합 단백질의 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 3부로 된 리더 서열에 결합될 수 있다. 이 키메라 유전자는 이후 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에서 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈에서의 비필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에서의 삽입은 감염된 숙주에서 융합 단백질을 발현할 수 있고 생존 가능한 재조합 바이러스를 발생시킬 것이다. 예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359 (1984)]을 참조한다. 특정한 개시 신호는 삽입된 융합 단백질 코딩 서열의 효율적인 번역에 또한 필요할 수 있다. 이 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 더욱이, 개시 코돈은 전체 삽입체의 번역을 보장하도록 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 서로 작동하게 있어야 한다. 이 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 다의 다양한 기원일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 증강인자 요소, 전사 종결인자 등의 삽입에 의해 증대될 수 있다(문헌[Bittner et al., Methods in Enzymol., 153:51-544 (1987)] 참조).

[0364]

또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 원하는 특정한 방식으로 유전자 생성물을 변형시키고 가공처리하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글라이코실화) 및 가공처리(예를 들어, 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역 후 가공처리 및 변형에 대한 특징적이고 특이적인 기전을 가진다. 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공처리를 보장하도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 위해, 1차 전사체의 적합한 가공처리, 글라이코실화 및 유전자 생성물의 인산화에 대한 세포 기계를 보유하는 진핵생물 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유류 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, NSO, 293, 3T3, W138, 특히 유방암 세포주, 예를 들어 BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상 유선 세포주, 예를 들어 CRL7030 및 Hs578Bst를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0365]

장기간 동안, 재조합 단백질의 고수율 생성, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 융합 단백질을 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다는, 숙주 세포는 적절한 발현 제어 유전요소(예를 들어, 프로모터, 증강인자, 서열, 전사 종결인자, 폴리아데닐화 부위 등), 및 선택 가능한 마커에 의해 제어되는 DNA에 의해 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포는 농후한 배지에서 1일 내지 2일 동안 성장하게 허용될 수 있고, 이후 선택적 배지로 스위칭된다. 재조합 플라스미드에서의 선택 가능한 마커는 선택에 내성을 부여하고, 세포가 이의 염색체로 플라스미드를 안정하게 통합하고 병소(이는 결국 클로닝되고 세포주로 증식될 수 있음)를 형성하도록 성장하게 한다. 융합 단백질을 발현하는 세포주를 조작하기 위해 유리하게는 이 방법을 사용할 수 있다. 이러한 조작된 세포주는 융합 단백질과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물의 스크리닝 및 평가에서 특히 유용할 수 있다.

[0366]

단순 포진 바이러스 타이미딘 키나제(Wigler et al., Cell, 11:223 (1977)), 하이폭산탄-구아닌 포스포리보실전환효소(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:202 (1992)) 및 아데닌 포스포리보실전환효소(Lowy et al., Cell, 22:817 (1980))(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 다수의 선택 시스템을 사용할 수 있고, 유전자는 각각 tk-, hgprt- 또는 aprt- 세포에서 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성을 하기 유전자에 대한 선택의 기초로서 사용될 수 있다: 메토트렉세이트에 내성을 부여하는 dhfr(Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); 마이코페놀산에 내성을 부여하는 gpt(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); 아미노글라이코사이드 G-418에 내성을 부여하는 neo(Wu and Wu, Biotherapy, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596 (1993); Mulligan, Science, 260:926-932 (1993); 및 Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62:191-217 (1993); Can., 1993, TIB TECH 11(5):155-215); 및 하이그로마이신에 내성을 부여하는 hygro(Santerre et al., Gene, 30:147 (1984)). 재조합 DNA 기법의 분야에 흔히 공지된 방법은 원하는 재조합 클론을 선택하도록 일상적으로 적용될 수 있고, 이러한 방법은 예를 들어 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (John Wiley & Sons, NY 1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, NY 1990); 및 Current Protocols in Human Genetics, Dracopoli et al., eds. (John Wiley & Sons, NY 1994), Chapters 12 and 13; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981)](이들은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0367]

본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가할 수 있다(검토를 위해, 문헌[Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)] 참조). 융합 단백질을 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭 가능할 때, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 저해제의 수준의 증가는

마커 유전자의 카피의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열과 연관되므로, 조작된 융합 단백질의 제조는 또한 증가할 것이다(Crouse et al., Mol. Cell. Biol., 3:257 (1983)).

[0368] 숙주 세포는 제1 융합 단백질을 코딩하는 제1 벡터 및 제2 융합 단백질을 코딩하는 제2 벡터의 본 발명의 2개의 발현 벡터에 의해 동시형질감염될 수 있다. 2개의 벡터는 융합 폴리펩타이드의 동일한 발현이 가능하게 하는 동일한 선택 가능한 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 융합 폴리펩타이드 둘 다를 코딩하고 이들을 발현할 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 융합 폴리펩타이드 둘 다를 코딩하는 바이시스템론성 발현 카세트는 발현 벡터로 삽입된다(Proudfoot, Nature, 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197 (1980)).

[0369] 본 발명의 융합 단백질이 동물에 의해 제조되거나 재조합으로 발현되면, 이것은 단백질 정제에 대한 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도(특히 단백질 A 후 특이적 항원에 대한 친화도에 의함) 및 사이징 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도에 의해 또는 단백질 정제에 대한 임의의 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질은 정제를 수월하게 하도록 본 명세서에 기재되거나 달리 당해 분야에 공지된 비상동성 폴리펩타이드 서열에 융합될 수 있다.

[0370] 친화도 정제의 목적을 위해, 친화도 크로마토그래피에 대한 관련 기질, 예컨대 글루타티온, 아밀라제, 및 니켈 또는 코발트 접합된 수지를 사용한다. 많은 이러한 기질은 히스티딘 태그화된 융합 단백질과 유용한 "키트" 형태, 예컨대 Pharmacia GST 정제 시스템 및 QIAexpress(상표명) 시스템(Qiagen(등록상표))에서 이용 가능하다. 태그는 또한 재조합된 재조합 융합 단백질의 검출을 수월하게 할 수 있다. 이러한 태그의 예는 다양한 형광성 단백질(예를 들어, GFP), 및 "에피토프 태그"(보통 특이적 항체가 이용 가능한 짧은 웨بت이드 서열임)를 포함한다. 특이적 단일클론 항체가 용이하게 이용 가능한 널리 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 혈구응집소 (HA) 및 c-myc 태그를 포함한다. 몇몇 경우에, 융합 도메인은 예컨대 Xa 인자 또는 트롬빈에 대한 프로테아제 절단 부위를 가지고, 이것은 관련 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 분해하고 이로써 이로부터 재조합 단백질을 방출하게 한다. 이후, 방출된 단백질은 후속하는 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다.

[0371] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열이 본 명세서에 포함된다.

[0372] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자일 수 있다. 이들 벡터는 당해 분야에 공지되어 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드가 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 플라스미드는 박테리아 플라스미드이다. 기재된 벡터의 일 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 예를 들어, 플라스미드(벡터)는 박테리아, 예를 들어 에스체리치아 콜라이에서의 재조합 단백질 발현을 위한 발현 플라스미드이다. 기재된 발현 벡터의 일 실시형태에서, 발현 벡터는 박테리아 발현 벡터이다. 기재된 발현 벡터의 일 실시형태에서, 발현 벡터는 원핵생물 발현 벡터이다. 기재된 발현 벡터의 일 실시형태에서, 발현 벡터는 진핵생물 발현 벡터이다. 기재된 발현 벡터의 일 실시형태에서, 발현 벡터는 포유류 발현 벡터이다. 일 실시형태에서, 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다.

[0373] 또 다른 실시형태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 핵산을 포함하는 바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다.

[0374] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 본 명세서에 제공된다. 세포는 박테리아, 효모 세포, 포유류 세포 등일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 플라스미드를 보유하는 이. 콜라이. 예를 들어, 핵산에 코딩된 융합 단백질의 재조합 단백질 발현을 위한.

[0375] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 입자를 포함하는 세포가 본 명세서에 제공된다.

- [0376] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공되고, 상기 방법은 (a) 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포, 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 플라스미드), 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자, 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 입자를 배양하는 단계(여기서, 배양은 기재된 융합 단백질이 발현되는 조건 하에 수행됨); 및 (b) 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0377] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다, 구체적으로, 상기 방법은 (a) 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포, 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터(예를 들어, 플라스미드), 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 바이러스 입자, 또는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 입자를 배양하는 단계(여기서, 배양은 기재된 융합 단백질이 발현되는 조건 하에 수행됨); 및 (b) 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0378] 융합 단백질을 제조하기 위해 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 원핵생물 세포, 예컨대 박테리아이다. 융합 단백질을 제조하기 위해 기재된 방법의 일 실시형태에서, 세포는 박테리아 세포이다. 일 실시형태에서, 박테리아는 에스체리치아 콜라이(이. 콜라이)이다. 또 다른 실시형태에서, 박테리아는 약독화된 비. 안트라시스 균주(예를 들어CDC 684)이다.
- [0379] 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 제조하는 방법의 일 실시형태에서, 세포는 효모 세포이다. 일 실시형태에서, 효모는 사카로마이세스 세레비시아에이다. 일 실시형태에서, 효모는 세포 글라이코실화 결핍된다.
- [0380] 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 제조하는 방법의 일 실시형태에서, 효모는 글라이코실화 및 프로테아제 결핍된다. 일 실시형태에서, 프로테아제는 퓨린 또는 퓨린 유사 프로테아제이다.
- [0381] *
- [0382] *본 명세서에 기재된 융합 단백질을 제조하는 방법의 일 실시형태에서, 세포는 포유류 세포이다. 일 실시형태에서, 포유류 세포는 COS 세포, CHO 세포 또는 NSO 세포이다.
- [0383] **조성물**
- [0384] 일 양태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물이 본 명세서에 기재된다. 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함한다.
- [0385] 몇몇 양태에서, 이전의 문단에 기재된 임의의 조성물 또는 이전의 문단에 기재된 융합 단백질을 포함하는 임의의 조성물은 통증의 치료를 위한 용도이다. 통증의 치료는 이전의 문단에 기재된 상이한 조성물의 1회 초과, 즉 수회 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, LFn, LF, EFn 또는 EF를 포함하는 융합 단백질을 포함하는 조성물, 및 융합 단백질에 존재하는 통각수용체 수용체 결합 단백질이 존재하는 경우, 조성물은 바람직하게는 PA, PA 단편, PA의 단편을 함유하는 PAd4, 또는 PA의 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 조성물과 조합되어 사용될 것이다.
- [0386] 몇몇 실시형태에서, 조성물은 2개 이상의 상이한 조작된 융합 단백질, 예를 들어 상이한 제1 도메인 및/또는 제2 도메인을 가지는 융합 단백질을 포함할 수 있다. 단백질의 이러한 혼합물은 예를 들어 오프 타깃 효과를 감소시키고/시키거나 효능을 증가시키기 위해 통각수용체를 저해하는 다수의 기전을 제공할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 2개 이상의 상이한 조작된 융합 단백질은, 올리고머 복합체가 적어도 2개의 상이한 조작된 융합 단백질을 포함하도록, 올리고머 형태일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제1 조작된 융합 단백질은 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 제1 도메인을 가지고; 제2 조작된 융합 단백질은 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하는 제1 도메인을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0387] 폴리펩타이드가 탄저병 독소 전위 펩타이드를 포함할 때, 전위 펩타이드는 폴리펩타이드가 존재하는 PA 및/또는 mPA에 의해 결합되고 막에 걸쳐 전위되게 한다. 따라서, PA 및/또는 mPA 및 전위되는 폴리펩타이드(예를 들어,

독소)는 별개의 폴리펩타이드로서 존재할 수 있다. 일 양태에서, 이후

[0388] (I) a) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티; 및 임의로

[0389] b) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티

[0390]로 이루어진 군으로부터 선택된 제1 폴리펩타이드; 및

[0391] (II) c) 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX))와 융합된 탄저병 전위 신호 펩타이드;

[0392] d) 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인과 융합된 탄저병 전위 신호 펩타이드; 및/또는

[0393] e) 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)

[0394]로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 본 명세서에 기재된다.

[0395] 이러한 조성물의 일 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX))와 융합된 탄저병 독소 전위 펩타이드를 포함한다.

[0396] 이러한 조성물의 또 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인과 융합된 탄저병 독소 전위 펩타이드를 포함한다. 제2 폴리펩타이드의 다른 실시형태에서, 탄저병 독소 전위 펩타이드는 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인, H_N 또는 다중양이온성 서열에 의해 대체된다.

[0397] 이러한 조성물의 또 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티; 또는 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하고; 제2 폴리펩타이드는 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)를 포함한다.

[0398] 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 이러한 조성물의 또 다른 실시형태에서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태이다. 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 이러한 조성물의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 및 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티 둘 다를 포함한다. 일 실시형태에서, 2개의 상이한 제1 폴리펩타이드인 i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 및 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티는 올리고머 복합체가 폴리펩타이드 둘 다를 포함하도록 올리고머 형태이다. 일 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0399] 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 조성물은 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 또 다른 실시형태에서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된다.

[0400] 본 명세서에 기재된 LFn, LF, EF 또는 EFn 함유 융합 단백질을 포함하는 임의의 조성물의 일 실시형태에서, 조성물은 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, PA 단백질은 올리고머 PA이다. 또 다른 실시형태에서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된다.

[0401] 통증 치료를 위한 조작된 융합 단백질 및 조성물의 용도

[0402] 개별적으로 또는 조합되어 사용되는 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 포함하는 임의의 조성물은 통증의 치료에 사용될 수 있다. 유사하게, 본 명세서에 기재된 임의의 융합 단백질은 통증의 치료에 사용될 수 있다. 더구나, 기재된 조성물의 다양한 조합 또는 기재된 조작된 융합 단백질의 다양한 조합이 통증의 치료에 사용될 수 있는 것으로 고안된다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질 및 조성물은 통각수용체에 선택적으로 결합하고, 통각수용체 세포를 사멸하고/하거나 저해하는 독소를 전달할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 다른 뉴런은 본 명세서에 기재된 융합 단백질 및/또는 조성물에 의해 영향을 받지 않는다.

[0403] 또 다른 양태에서, 이전의 문단에 기재된 하나 이상의 융합 단백질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부

형제를 포함하는, 약제학적 조성물을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0404] 또 다른 양태에서, 통증의 치료를 위한 약제의 제조에서의 용도를 위한 이전의 문단에 기재된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 제제화된다.

[0405] 또 다른 양태에서, 통증의 치료에서의 용도를 위한 이전의 문단에 기재된 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 제제화된다.

[0406] 따라서, 일 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 하나 초파의 조성물은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, LFn, LF, EFn 또는 EF를 포함하는 융합 단백질, 및 융합 단백질에 존재하는 통각수용체 수용체 결합 단백질이 존재하는 경우, 조성물은 바람직하게는 PA, PA 단편, PA의 단편을 함유하는 PAd4, 또는 PA의 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 조성물과 조합되어 사용될 것이다.

[0407] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx) 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질(여기서, 파트 (a) 및 (b)는 함께 연결되거나 융합됨), 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0408] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) 비세포독성 프로테아제(여기서, 프로테아제는 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있음); 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, PA 또는 이의 PA 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0409] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) 통각수용체 뉴런에서 이온 채널을 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(TM)(여기서, 통각수용체 뉴런은 내부에 이온 채널을 발현함)를 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0410] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소; 및 (b) 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합하는 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 PA 단편에 결합할 수 있는 단백질을 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0411] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) AB 독소; (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편(여기서, PA 또는 이의 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함); 및 (c) 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토솔로 독소(프로테아제)를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(TL)을 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0412] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 탄저병 독소 보호성 항원(PA)의 C 말단 수용체 결합 도메인에 연결된, BTx의 N 말단 효소 도메인(LC 또는 L 사슬) 및 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N)을 포함하는 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티를 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0413] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 (a) 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티의 보툴리눔 신경독소 N 말단 효소 도메인 및 (b) 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자(EFn)의 N 말단 도메인에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태에 결합함)를 포함하는 융합 단백질(여기서, 파트 (a)는 파트 (b)에 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결됨), 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0414] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은, 다이설파이드 함유 펩타이드 독소에 연결된, 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4), 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0415] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)에 대한 하나 이상의 부위에서 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 작동 가능하게 연결된 다이설파이드 함유 펩타이드 독소(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태에 결합함)를 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0416] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 탄저병 독소 보호성 항원(PAd4 도메인)의 C 말단 수용체 결합 도메인에 연결된 링커 펩타이드에 융합된 AB 독소(여기서, 융합 단백질은 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 무효화하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형된 또는 돌연변이된 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함함)를 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0417] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 탄저병 독소 보호성 항원(PAd4 도메인)의 C 말단 수용체 결합 도메인에 융합된 클로스트리듐 신경독소 또는 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소로부터의 전위/기공 형성 도메인과 함께 N 말단 효소 도메인(사슬 A)을 포함하는 융합 단백질, 또는 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0418] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA)(여기서, mPA는 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이됨), 및 특이적으로 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 치사 인자(LF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0419] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티, 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다(ANTXR2는 PA에 대한 네이티브 수용체임).
- [0420] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 통각수용체 표면 수용체 또는 통각수용체 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA), 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다(ANTXR2는 PA에 대한 네이티브 수용체임).
- [0421] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소, 예를 들어 코노톡신(CTx)과 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(PAd4)을 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0422] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0423] 또 다른 양태에서, 통증을 치료하는 방법이 본 명세서에 기재되고, 상기 방법은 클로스트리듐 신경독소의 L 사슬과 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질, 또는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 이 융합 단백질은 클로스트리듐 신경독소의 H 사슬의 벨트를 추가로 포함할 수 있고, 벨트는 H 사슬의 N 말단 분절이다.

- [0424] 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료될 수 있는 통증의 비제한적인 예는 만성 통증; 만성 신경병성 통증; 통증이 있는 당뇨병성 신경통(PDN), 대상포진 후 신경통(PHN); 3차 신경통(TN); 염증성 통증; 신경병성 통증; 이온 통로병증; 1차 피부홍통증(PE); 발작 극도 통증 장애(PEPD); 척수 상해 통증; 다발성 경화증 통증; 환각지통증; 뇌졸중 후 통증; 만성 요통; 골관절염 통증; 암 연관 통증; HIV 연관 통증; 만성 염증성 통증; 중추 신경통; 말초 신경통; 마취 고통; 통각과민; 통각과민; 이상감각; 심인성 통증; 요통; 돌발성 통증; 피부홍통증; 신경 압박 및/또는 포착[예를 들어, 수근관 증후군, 족근관 증후군, 척골 신경 포착, 압박 신경근병증, 방사성 요통, 척수 뿌리 병변, 척수 뿌리 압박, 요추 척추관 협착증, 좌골 신경 압박 및/또는 늑간 신경통]; 신경염; 화학치료로부터의 통증; 만성 알콜증독(알콜성 다발성 신경통); 류마티스성 관절염 통증; 화상과 연관된 통증; 뇌염 통증; 골절 통증; 신경염 통증; 자가면역 질환 통증; 수술 후 통증; 치아 통증; 박테리아 감염, 예를 들어 박테리아 감염 또는 바이러스 감염과 연관된 통증; 방사선치료와 연관된 통증; 장과 연관된 통증 및 자극성 장증후군; 외상(예컨대, 열상, 절개, 화상, 외래 물체 또는 총알 및/또는 유산탄 상해, 척수 상해, 완신경총 박리, 신경 압박 및/또는 포착)으로부터의 통증; 신경 횡단; 내장 통증(예컨대, 신장 또는 수뇨관 산통, 자극성 장 증후군, 협심증 또는 심장 통증, 심장 부정맥, 기간 통증, 간질성 방광염, 직장 통증, 설사, 충수염, 담낭염 및 체장염과 연관된 통증); 요독증 통증; 갑상선기능저하증과 연관된 통증; 비타민 결핍증과 연관된 통증; 두통 통증(예를 들어, 장력 두통, 편두통 및 클러스터 두통); 특발성 통증(예를 들어, 3차 신경통, 복합 부위 통증 증후군 [예를 들어 복합 부위 통증 증후군 I 및/또는 복합 부위 통증 증후군 II], 이질통 또는 섬유근육통); 호흡기 통증(예를 들어, 천식, 천식에서의 기도 과민성, 예를 들어 천식 및/또는 만성 폐쇄성 폐 장애에서의 만성 감기와 연관된 통증); 섬유근육통; 호르몬 치료 통증; 갑상선기능저하증 통증; 뇌전증 통증; 운동실조; 주기성 사지마비; 급성 간지러운 및/또는 만성 간지러운 통증을 포함할 수 있다.
- [0425] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 사용함으로써 치료하는 통증은 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 및 다른 전신 통증 장애로부터 선택된다.
- [0426] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 사용함으로써 치료하는 통증은 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 및 근육 통증으로부터 선택된다.
- [0427] 일 실시형태에서, 투여되는 조성물은 제1 폴리펩타이드(또는 융합 단백질) 및 제2 폴리펩타이드(또는 융합 단백질)를 포함하고, 제1 폴리펩타이드는 투여 전에 제2 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0428] 또 다른 양태에서, 통증의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있고, 상기 방법은
- [0429] a) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티; 및/또는
- [0430] b) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하는 제1 조성물; 및
- [0431] c) (i) 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 전위 신호펩타이드;
- [0432] (ii) 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인과 융합된 탄저병 독소 전위 웨პ타이드; 및/또는
- [0433] (iii) 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 탄저병 독소 치사 인자(LF)를 포함하는 제2 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0434] 통증을 치료하는 방법에 도출된 임의의 양태에서, 투여는 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 또는 중추 신경계로의 경막외 주사에 의해, 또는 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사 를 사용한 말초 투여에 의해 수행될 수 있다.
- [0435] 따라서, 일 실시형태에서, 유효 통증 감소량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 이를 요하는 대상체에게 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사에 의해 말초로 투여하는 단계를 포함하는 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증의 치료를 위한 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0436] 또 다른 실시형태에서, 유효 통증 감소량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 이를 요하는 대상체의 중추 신경계로 경막외 주사, 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애의 치료를 위한 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

- [0437] 본 명세서에 기재된 통증을 치료하는 임의의 방법의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 유효 통증 감소량은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제에서 탄저병 보호성 항원(PA)을 포함하는 조성물을 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 투여한 후에 별개로 투여된다.
- [0438] 본 명세서에 기재된 통증을 치료하는 방법의 일 실시형태에서, 상기 방법은 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0439] PA가 통증 치료를 위해 투여되는 융합 단백질의 일부 또는 조성물의 일부인 본 명세서에 기재된 양태의 일 실시 형태에서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태로 투여된다. 일 실시형태에서, 올리고머 PA 또는 mPA는 수용체 보유 세포에 대한 증가한 결합활성을 달성하도록 단백질분해로 활성화된 PA 또는 mPA(또는 이의 돌연변이체)로부터 형성된다. 비제한적인 예로서, PA는 이온 교환 칼럼에서 2개의 단편(예를 들어, PA63 및 PA20)을 낙킹하고 이후 분리시키도록 트립신에 의해 처리될 수 있다. pH가 약 pH 8.0 초과에서 유지되는 경우, PA63은 올리고머(예를 들어, 헵타머)를 용리시키고 단백질분해로 활성화된 프리포어 상태로 유지될 것이다. 올리고머 및/또는 단백질 분해로 활성화된 PA의 제조는 당해 분야에, 예를 들어 문헌[Milne et al, JBC 269: 20607-20612, 1994](본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0440] 제1 조성물 및 제2 조성물을 투여하는 것을 수반하는 양태의 일 실시형태에서, 제1 조성물은 i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 및 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티 둘 다를 포함한다. i) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 및 ii) 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 돌연변이체 탄저병 독소 보호성 항원(mPA) 모이어티를 포함하는 제1 조성물의 투여를 포함하는 또 다른 실시 형태에서, 올리고머 복합체가 폴리펩타이드 둘 다를 포함하도록 2개의 상이한 제1 폴리펩타이드는 올리고머 형태이다. 일 실시형태에서, 제1 조성물은 제2 조성물의 투여 전에, 동시에 또는 후에 별개의 주사로 투여된다.
- [0441] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 통증을 가지거나 가지는 것으로 진단된 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 방법은 통증을 경감시키기 위해 본 명세서에 기재된 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "통증을 경감시킨다"는 통증과 연관된 임의의 병태 또는 증상을 완화한다는 것이다. 균등한 비치료된 대조군과 비교하여, 이러한 감소는 임의의 표준 기법에 의해 측정될 때 적어도 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 이것 초과이다. 본 명세서에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하기 위한 다양한 수단은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 이러한 방법은 경구, 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도(에어로졸), 폐, 피부, 국소, 주사 또는 종양내 투여를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 투여는 국소 또는 전신일 수 있다.
- [0442] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 질환 또는 장애의 적어도 하나 이상의 증상을 경감시키는 데 필 요한 조성물의 양을 의미하고, 원하는 효과를 제공하도록 약물학적 조성물의 충분한 양을 의미한다. 용어 "치료학적 유효량"은 따라서 통상적인 대상체에게 투여될 때 특정한 진통 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 양을 의미한다. 다양한 맥락에서 본 명세서에 사용된 바와 같은 유효량은 또한 질환의 증상의 발생을 지연시키거나, 질환의 증상의 과정을 변경하거나(예를 들어, 질환의 증상의 진행의 느려짐(이들로 제한되지는 않음)), 질환의 증상을 역전시키기에 충분한 양을 포함할 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 기술하는 것이 일반적으로 실행 가능하지 않다. 그러나, 임의의 소정의 경우에, 적절한 "유효량"은 유일한 일상적 실험을 이용하여 당해 분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있다.
- [0443] 유효량, 독성 및 치료학적 효능은 예를 들어 LD50(집단의 50%에 치사인 용량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료학적 유효 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 투약량은 사용된 제형 및 사용된 투여 경로에 따라 변할 수 있다. 독성 효과와 치료학적 효과 사이의 용량 비율은 치료학적 지표이고, 비율 LD50/ED50로서 표시될 수 있다. 큰 치료학적 지표를 나타내는 조성물 및 방법이 바람직하다. 치료학적 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 초기에 예상될 수 있다. 또한, 용량은, 세포 배양물 또는 적절한 동물 모델에서 결정된 바대로, IC50(즉, 증상의 최대 반 저해를 달성하는 활성 성분의 농도)을 포함하는 순환하는 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 제제화될 수 있다. 혈장에서의 수준은 예를 들어 고 성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다. 임의의 특정한 투약량의 효과는 적합한 생물검정에 의해 모니터링될 수 있다. 투약량은 의사에 의해 결정되고, 필요한 바대로, 치료의 관찰된 효과에 맞도록 조정될 수 있다.

[0444]

본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 기법은 약제학적 본 명세서에 기재된 바와 같은, 임의로 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합된, 조성물에 관한 것이다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 식염수, 수성 완충제 용액, 용매 및/또는 분산 매질을 포함한다. 이러한 담체 및 희석제의 사용은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 작용할 수 있는 재료의 몇몇 비제한적인 예는 (1) 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; (2) 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말화 트라가칸스; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활택제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 세레이트 및 탈크; (8) 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 와스; (9) 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두 오일; (10) 글라이콜, 예컨대 프로필렌 글라이콜; (11) 폴리올, 예컨대 글라이세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글라이콜(PEG); (12) 에스터, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원 비합유 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스터, 폴리카보네이트 및/또는 폴리언하이드라이드; (22) 벌크화제, 예컨대 폴리펩타이드 및 아미노산 (23) 혈청 성분, 예컨대 혈청 알부민, HDL 및 LDL; (22) C2-C12 알콜, 예컨대 에탄올; 및 (23) 약제학적 제제에서 사용되는 다른 비독성 상용성 물질을 포함한다. 습윤제, 착색제, 이형제, 코팅제, 감미료, 착향료, 향료, 보존제 및 항산화제는 제제에 또한 존재할 수 있다. 용어 예컨대 "부형제", "담체", "약제학적으로 허용 가능한 담체" 등은 본 명세서에서 상호교환되어 사용된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 담체는 활성 물질, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 분해를 저해한다.

[0445]

약제학적 조성물을 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 비경구 제형일 수 있다. 비경구 제형의 투여가 통상적으로 오염물질에 대한 환자의 자연 방어를 우회하므로, 비경구 제형은 바람직하게는 무균이거나 환자에게 투여 전에 무균화될 수 있다. 비경구 제형의 예는 주사에 준비된 용액, 주사를 위해 약제학적으로 허용 가능한 비허를 중에 용해되거나 혼탁될 준비가 된 건조 제품, 주사에 준비된 혼탁액 및 에멀션을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, DUROS(등록상표) 타입 제형 및 용량 덤팽(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는, 제어 방출 비경구 제형은 환자의 투여에 준비될 수 있다.

[0446]

비경구 제형을 제공하기 위해 사용될 수 있는 적합한 비허들은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예는, 제한 없이, 무균수; 주사용수 USP; 식염수 용액; 글루코스 용액; 수성 비허, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 나트륨 클로라이드 주사 및 락트산염화 링거 주사(이들로 제한되지는 않음); 수증화성 비허, 예컨대 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글라이콜 및 프로필렌 글라이콜(이들로 제한되지는 않음); 및 비수성 비허, 예컨대 옥수수유, 면실유, 땅콩유, 참깨유, 에틸 올레이트, 아이소프로필 미리스테이트 및 벤질 벤조에이트(이들로 제한되지는 않음)를 포함한다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 조성물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 용해도를 변경하거나 변형시키는 화합물은 종래의 및 제어 방출 비경구 제형을 포함하여 본 개시 내용의 비경구 제형으로 또한 혼입될 수 있다.

[0447]

종래의 제형은 일반적으로 제제로부터 신속한 또는 즉시 약물 방출을 제공한다. 약물의 약리학 및 약동학에 따라, 종래의 제형의 사용은 환자의 혈액 및 다른 조직에서의 약물의 농도를 넓게 변동시킬 수 있다. 이 변동은 다수의 매개변수, 예컨대 투약 빈도, 작용 개시, 효능 기간, 치료학적 혈액 수준의 유지, 독성, 부작용 등에 영향을 미칠 수 있다. 유리하게는, 제어 방출 제제는 약물의 작용 개시, 작용 기간, 치료학적 창 내의 혈장 수준 및 피크 혈액 수준을 제어하도록 사용될 수 있다. 특히, 잠재적인 부작용 및 안전성 우려(약물량 이하 투약(즉, 최소 치료학적 수준 아래임), 및 약물에 대한 독성 수준을 초과의 둘 다에서 발생할 수 있음)를 최소화하면서 약물의 최대 효과가 달성되도록 제어 또는 연장 방출 제형 또는 제제를 사용할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 조성물은 지속되는 방출 제제에서 투여될 수 있다.

[0448]

제어 방출 약제학적 생성물은 이의 비제어 방출 대응물에 의해 달성되는 것에 비해 약물 치료를 개선하는 것의 일반 목표를 가진다. 이상적으로, 의학 치료에서의 최적으로 설계된 제어 방출 제제의 사용은 최소 시간에 병태를 치유하고 제어하기 위해 사용되는 약물 물질의 최소를 특징으로 한다. 제어 방출 제제의 이점은 1) 연장된 약물의 활성; 2) 감소한 투약 빈도; 3) 환자 순응도의 증가; 4) of 더 적은 총 약물의 사용; 5) 국소 또는 전신 부작용의 감소; 6) 약물 축적의 최소화; 7) 혈액 수준 변동의 감소; 8) 치료의 효능의 개선; 9) 약물 활성의 강화 또는 소실의 감소; 및 10) 질환 또는 병태의 제어의 속도의 개선을 포함한다. Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000).

[0449]

대부분의 제어 방출 제제는 연장된 시간 기간에 걸쳐 치료학적 또는 예방학적 효과의 이 수준을 유지시키도록 원하는 치료학적 효과를 즉시 생성하는 약물(활성 성분)의 양을 초기에 방출하고, 점진적으로 및 연속하여 약물

의 다른 양을 방출하도록 설계된다. 신체에서 약물의 이 일정한 수준을 유지시키기 위해, 약물은 대사되는 약물의 양을 대체하는 속도로 제형으로부터 방출되고 신체로부터 배설되어야 한다. 활성 성분의 제어 방출은 pH, 이온 농도, 삼투압, 온도, 효소, 물, 및 다른 생리학적 조건 또는 화합물(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 다양한 조건에 의해 자극될 수 있다.

[0450] 다양한 공지된 서방 또는 연장 방출 제형, 제제 및 장치는 본 개시내용의 염 및 조성물과 사용하도록 채택될 수 있다. 예는 미국 특허 제3,845,770호; 제3,916,899호; 제3,536,809호; 제3,598,123호; 제4,008,719호; 제5674,533호; 제5,059,595호; 제5,591,767호; 제5,120,548호; 제5,073,543호; 제5,639,476호; 제5,354,556호; 제5,733,566호; 및 제6,365,185호 B1(이들은 각각 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이들 제형은 다양한 비율의 원하는 방출 프로필을 제공하도록 예를 들어 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 겔, 투과성 막, 삼투성 시스템(예컨대, OROS(등록상표)(Alza Corporation(미국 캘리포니아주 마운틴 뷰))), 또는 이들의 조합을 사용하여 하나 이상의 활성 성분의 서방 또는 제어 방출을 제공하도록 사용될 수 있다.

[0451] 본 명세서에 기재된 방법은 예를 들어 조합 치료의 일부로서 대상체에게 제2 물질 및/또는 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 제2 물질 및/또는 치료제의 비제한적인 예는 진통제, 소염제 및 통증 및/또는 통증을 야기하는 병태를 치료하기 위한 다른 약제를 포함할 수 있다.

[0452] 조성물의 유효 용량의 투여를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 유효 용량은 환자에게 한번 투여될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 조성물의 유효 용량은 환자에게 반복하여 투여될 수 있다. 전신 투여를 위해, 대상체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 치료학적 양, 예를 들어 0.1mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 2.0mg/kg, 2.5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg, 50mg/kg, 또는 이것 초과가 투여될 수 있다.

[0453] 통증의 치료를 위한 조성물의 투여를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 초기 치료 섭생 후, 치료는 덜 빈번한 기준으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 3개월 동안 주마다의 치료 후, 치료는 6개월 또는 년 또는 이보다 길게 주마다 1회 반복될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법에 따른 치료는 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 이상으로 병태, 예를 들어 통증의 마커 또는 증상의 수준을 감소시킬 수 있다.

[0454] 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 투약량은 의사에 의해 결정되고, 필요한 바대로, 치료의 관찰된 효과에 맞도록 조정될 수 있다. 치료의 기간 및 빈도와 관련하여, 치료가 치료학적 이익을 제공할 때를 결정하고, 투약량을 증가시키거나 감소시키거나, 투여 빈도를 증가시키거나 감소시키거나, 치료를 중단하거나, 치료를 재개하거나, 치료 섭생에 다른 변경을 할지를 결정하기 위해 숙련된 임상의가 대상체를 모니터링하는 것이 통상적이다. 투약 스케줄은 다수의 임상 인자, 예컨대 조성물에 대한 대상체의 감수성에 따라 1주 1회 내지 매일 변할 수 있다. 활성화의 원하는 용량 또는 양은 한 번에 투여되거나 하위용량, 예를 들어 2개 내지 4개의 하위용량으로 분할되고 시간 기간에 걸쳐, 예를 들어 일에 걸쳐 적절한 간격으로 또는 다른 적절한 스케줄로 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 투여는 주 또는 달의 기간에 걸쳐 매일 하나 이상의 용량 및/또는 치료와 같이 만성일 수 있다. 투약 및/또는 치료 스케줄의 예는 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월 이상의 기간에 걸쳐 매일, 매일 2회, 매일 3회 또는 매일 4회 이상의 투여이다. 조성물은 시간 기간에 걸쳐, 예컨대 5분, 10분, 15분, 20분 또는 25분 기간에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0455] 본 명세서에 기재된 방법에 따른 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물의 투여에 대한 투약량 범위는 예를 들어 활성 성분의 형태, 이의 효력, 및 본 명세서에 기재된 병태의 증상, 마커 또는 표시자가 감소되도록 원해지는 정도, 예를 들어 통증에 대해 원해지는 감소의 백분율에 따라 달라진다. 투약량은 부작용을 야기하도록 크지 않아야 한다. 일반적으로, 투약량은 환자의 연령, 컨디션 및 성별에 따라 변할 것이고, 당해 분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있다. 투약량은 임의의 합병증의 경우에 개별 의사에 의해 또한 조정될 수 있다.

[0456] 예를 들어, 본 명세서에 기재된 병태의 치료에서, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 반응(예를 들어, 통증의 감소)을 유도하기 위한 조성물의 효능은 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 치료는, 그 용이가 본 명세서에서 사용되면서, 본 명세서에 기재된 병태의 하나 이상의 징후 또는 증상이 유익한 방식으로 변경되면, 다른 임상적으로 인정된 증상이 개선되거나 심지어 경감되거나, 원하는 반응이 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료 후 예를 들어 적어도 10% 유도될 때 "효과적인 치료"로 생각된다. 효능은 예를 들어 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된 병태의 마커, 표시자, 증상 및/또는 발생률 또는 적절한 임의의 다른 측정 가능한 매개변수

를 측정함으로써 평가될 수 있다. 효능은 입원으로 평가되는 것처럼 개체의 악화의 실패, 또는 의학 중재(즉, 질환의 진행이 중지됨)의 필요에 의해 또한 측정될 수 있다. 이를 표시자를 측정하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있고/있거나, 본 명세서에 기재되어 있다. 치료는 개체 또는 동물(몇몇 비제한적인 예는 인간 또는 동물을 포함)에서의 임의의 질환의 치료를 포함하고, (1) 질환의 저해, 예를 들어 증상(예를 들어, 통증 또는 염증)의 악화의 예방; 또는 (2) 예를 들어 증상의 퇴행을 야기하는 질환의 중증도의 완화를 포함한다. 질환의 치료에 대한 유효량은, 이를 요하는 대상체에게 투여될 때, 그 용어가 본 명세서에 정의되면서, 그 질환에 대한 효과적인 치료를 생성시키기에 충분한 양을 의미한다. 물질의 효능은 병태 또는 원하는 반응의 물리적 표시자를 평가함으로써 결정될 수 있다. 이러한 매개변수의 임의의 하나, 또는 매개변수의 임의의 조합을 측정함으로써 투여 및/또는 치료의 효능을 모니터링하는 것은 당해 분야의 숙련자의 능력 내에 있다. 효능은 본 명세서에 기재된 병태의 동물 모델, 예를 들어 통증의 마우스 모델의 치료에서 평가될 수 있다. 실험 동물 모델을 사용할 때, 마커의 통계학적으로 유의미한 변경, 예를 들어 이환된 부위에서의 자극에 대한 반응 또는 자극의 회피가 관찰될 때 치료의 효능이 입증된다.

[0457] 편의를 위해, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구항에 사용된 몇몇 용어 및 구절의 의미는 하기 제공된다. 달리 기재되거나 문맥으로부터 함축적이지 않는 한, 하기 용어 및 구절은 하기 제공된 의미를 포함한다. 정의는 특정한 실시형태를 기술하는 것을 돋도록 제공되고, 본 발명의 범위가 청구항에 의해 제한되므로 청구된 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다. 달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 당해 분야의 용어와 본 명세서에 제공된 이의 정의의 용법 사이의 명확한 차이가 있는 경우, 명세서 내 제공된 정의가 지배해야 한다.

[0458] 정의

[0459] 편의를 위해, 본원, 본 명세서, 예 및 첨부된 청구항에 사용된 소정의 용어가 여기에 수집된다.

[0460] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "할 수 있는"은, 동사와 사용될 때, 상응하는 동사의 작용을 포함하거나 의미한다. 예를 들어, "차단할 수 있는"은 또한 차단한다를 의미하고, "절단할 수 있는"은 또한 절단한다를 의미하고, "결합할 수 있는"은 또한 결합한다를 의미하고, "전위할 수 있는"은 또한 전위한다를 의미하고, "특이적으로 표적화할 수 있는"은 또한 특이적으로 표적화한다를 의미한다.

[0461] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "통각수용체 뉴런 결합 단백질" 또는 "통각수용체 결합 단백질"은, 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 언급하며 사용될 때, 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 폴리펩타이드 표적화 모이어티(TM)를 의미하고, 상호작용은 통각수용체 뉴런 내부에 엔도솜으로 혼입되는 내포작용을 겪는 뉴런의 그 결합 부위를 생성시킨다. 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은, 신경 성장 인자 수용체 또는 ANTXR2 또는 Nav1.7, Nav1 .8, 및 Nav1 .9 이온 채널 단백질과 같은, 통각수용체 뉴런의 세포 표면에서 발현된 수용체 또는 이온 채널에 결합하는 항체 또는 이의 항체 단편이다. 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 신경 성장 인자 수용체에 대한 신경 성장 인자 리간드와 같은 통각수용체 뉴런의 세포 표면 수용체에 대한 리간드이다. 일 실시형태에서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은, ANTXR2인 이의 수용체에 결합할 수 있는, PA 또는 PA의 변이체 형태 또는 이의 PA 단편이다. 일 실시형태에서, TM 표적은 통각수용체 뉴런에서 발현된 ANTXR2(CMG2) 수용체에 결합한다.

[0462] 일 실시형태에서, 수용체에 결합할 수 있고 결합하는 PA의 변이체 형태는 퓨린 프로테아제 및 퓨린 유사 프로테아제에 내성이다. 일 실시형태에서, PA의 변이체 형태는 퓨린 절단 부위에서 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된다. 몇몇 실시형태에서, PA^{퓨린}¹⁶⁴는 아미노산 잔기 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)에 대한 퓨린 절단 부위¹⁶⁴ RKKR¹⁶⁷에서 돌연변이된다. 아미노산 넘버링은 N 말단에서 29개의 잔기 신호 펩타이드가 없는 PA 폴리펩타이드를 참조한다. 일 실시형태에서, 수용체에 결합할 수 있는 이의 PA 단편은 PA63, 전장 PA 단백질의 퓨린 절단에 의해 생성된 단편 및 전장 네이티브 PA의 C 말단 수용체 결합 부분인 PAd4이다. 일 실시형태에서, 수용체에 결합할 수 있는 이의 PA 단편은 PAd4와 네이티브 PA에서 PAd4 도메인에 대한 N 말단인 적어도 1개 내지 60개의 연속적 아미노산 잔기이고, 이는 예상된 PAd4 서열과 추가 상류 서열이 PA의 C 말단 수용체 결합 셱션이라는 것을 의미한다.

[0463] 용어 "감소시킨다", "감소한", "감소" 또는 "저해한다"는 모두 통계적으로 유의미한 양의 감소를 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 몇몇 실시형태에서, "감소시킨다", "감소한", "감소" 또는 "저해한다"는 통상적으로 기준 수준(예를 들어, 소정의 치료의 부재)과 비교하여 적어도 10% 감소를 의미하고, 예를 들어 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적

어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 이것 초과의 감소를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "감소" 또는 "저해"는 기준 수준과 비교하여 완전한 저해 또는 감소를 포함하지 않는다. "완전한 저해"는 기준 수준과 비교하여 100% 저해이다. 감소는 바람직하게는 소정의 장애가 없는 개체에 대해 정상의 범위 내인 용인된 수준으로 떨어질 수 있다.

[0464] 용어 "증가한", "증가시킨다", "증대시킨다" 또는 "활성화한다"는 모두 통계적으로 유의미한 양의 증가를 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 용어 "증가한", "증가시킨다", "증대시킨다" 또는 "활성화한다"는 기준 수준과 비교하여 적어도 10%의 증가, 예를 들어 기준 수준과 비교하여 적어도 약 20% 또는 적어도 약 30% 또는 적어도 약 40% 또는 적어도 약 50% 또는 적어도 약 60% 또는 적어도 약 70% 또는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90%의 증가 또는 100%의 증가 이하 및 이것 포함 또는 10 내지 100%의 임의의 증가, 또는 기준 수준과 비교하여 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배 증가, 또는 2배 내지 10배의 임의의 증가 또는 이것 초과를 의미할 수 있다. 마커 또는 증상의 맥락에서, "증가"는 이러한 수준의 통계학적으로 유의미한 증가이다.

[0465] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "대상체"는 인간 또는 동물을 의미한다. 보통, 동물은 척추동물, 예컨대 영장류, 설치류, 가축 동물 또는 게임 동물이다. 영장류는 침팬지, 사이노몰거스 원숭이, 거미 원숭이 및 마카크, 예를 들어 붉은털원숭이를 포함한다. 설치류는 마우스, 랫트, 마멋, 흰담비, 토끼 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 게임 동물은 소, 말, 돼지, 사슬, 들소, 물소, 고양이 종, 예를 들어 가축 고양이, 개과 종, 예를 들어 개, 여우, 늑대, 조류 종, 예를 들어 닭, 예뮤, 타조, 및 어류, 예를 들어 송어, 메기 및 연어를 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 대상체는 포유류, 예를 들어 영장류, 예를 들어 인간이다. 용어, "개인", "환자" 및 "대상체"는 본 명세서에서 상호교환되어 사용된다.

[0466] 바람직하게는, 대상체는 포유류이다. 포유류는 인간, 비인간 영장류, 마우스, 랫트, 개, 고양이, 말 또는 소일 수 있지만, 이 예로 제한되지 않는다. 인간 이외의 포유류는 유리하게는 통증의 동물 모델을 나타내는 대상체로서 사용될 수 있다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다.

[0467] 대상체는 치료를 요하는 병태(예를 들어, 통증) 또는 이러한 병태와 관련된 하나 이상의 합병증을 겪거나 가지는 것으로 이전에 진단되거나 확인되고, 임의로, 통증 또는 통증과 관련된 하나 이상의 합병증에 대한 치료를 이미 받는 대상체일 수 있다. 대안적으로, 대상체는 또한 통증 또는 통증과 관련된 하나 이상의 합병증을 가지는 것으로 이전에 진단되지 않은 대상체일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 통증 또는 통증과 관련된 하나 이상의 합병증에 대한 하나 이상의 위험 인자를 나타내는 대상체 또는 위험 인자를 나타내지 않는 대상체일 수 있다.

[0468] 특정한 병태의 치료를 요하는 "대상체"는 그 병태를 가지는, 그 병태를 가지는 것으로 진단된, 또는 그 병태를 발생시킬 위험에 있는 대상체일 수 있다.

[0469] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "조작된"은 사람에 의해 조작되는 양태를 의미한다. 예를 들어, 융합 폴리펩타이드는, 사람에 의해 조작되는 폴리펩타이드의 서열 및/또는 코딩 핵산 서열이 이것이 자연에 존재하면서 폴리펩타이드의 서열과 다를 때, "조작된"이라 생각된다. 혼한 실행이고 당해 분야의 숙련자가 이해하는 것처럼, 조작된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드의 자손 및 카피는 실제 조작이 이전의 집합체에 수행되더라도 통상적으로 여전히 "조작된"이라 칭해진다.

[0470] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 인접한 잔기의 알파-아미노기와 카복시기 사이의 펩타이드 결합에 의해 서로에 연결된 일련의 아미노산 잔기를 지칭하도록 본 명세서에서 상호교환되어 사용된다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 이으 크기 또는 기능과 무관하게 변형된 아미노산(예를 들어, 인산화, 당화반응된, 글라이코실화 등) 및 아미노산 유사체를 포함하는 아미노산의 중합체를 의미한다. "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 대개 비교적 큰 폴리펩타이드를 언급하여 사용되는 한편, 용어 "펩타이드"는 대개 작은 폴리펩타이드를 언급하여 사용되지만, 용어 당해 분야에서 이들의 사용은 중첩한다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 유전자 생성물 및 이의 단편을 언급할 때 본 명세서에서 상호교환되어 사용된다. 따라서, 예시적인 폴리펩타이드 또는 단백질은 유전자 생성물, 천연 발생 단백질, 동족체, 오쏘로그, 파라로그, 상기의 단편 및 다른 등가물, 변이체, 단편 및 유사체를 포함한다.

[0471] 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 폴리펩타이드, 예를 들어 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부(예를 들어, 도메인)는 본 명세서에 기재된 서열의 변이체일 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 변이체는 보존적 치환 변이체이다. 본 명세서에 언급되는, "변이체"는 네이티브 또는 기준 폴리

펩타이드에 실질적으로 상동성이지만, 하나 또는 복수의 결실, 삽입 또는 치환으로 인해 네이티브 또는 기준 폴리펩타이드의 것과 다른 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드이다. 폴리펩타이드 코딩 DNA 서열은, 네이티브 또는 기준 DNA 서열과 비교할 때 뉴클레오타이드의 하나 이상의 부가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기준 단백질에 대해 관련 생물학적 활성, 예를 들어 야생형 기준 단백질의 적어도 50%를 보유하는 변이체 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 서열을 포함한다. 아미노산 서열에 관해, 숙련자는 단일 아미노산, 또는 코딩된 서열에서의 아미노산의 작은 백분율(즉, 5% 이하, 예를 들어 4% 이하, 또는 3% 이하, 또는 1% 이하)을 변경하는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 부가가 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식할 것이다(여기서, 변경은 화학적으로 유사한 아미노산에 의한 치환을 발생시킴). 보존적이든 또는 아니든, 변이체가 야생형의 활성의 100% 초과, 예를 들어 110%, 125%, 150%, 175%, 200%, 500%, 1000% 또는 이것 초과를 가지도록, 몇몇 변경이 잠재적으로 관련 활성을 개선할 수 있다고 고려된다.

[0472]

소정의 아미노산은 서로에 대해 하나의 지방족 잔기의 치환(예컨대, 서로에 대해 Ile, Val, Leu 또는 Ala), 또는 서로에 대해 하나의 극성 잔기의 치환(예컨대, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 사이)과 같이 유사한 물리화학적 특징을 가지는 잔기에 의해 대체될 수 있다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 가지는 전체 영역의 치환이 공지되어 있다. 보존적 아미노산 치환을 포함하는 폴리펩타이드는 네이티브 또는 기준 폴리펩타이드의 원하는 활성이 보유된다는 것을 확인하도록 본 명세서에 기재된 검정 중 임의의 하나에서 시험될 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 또한 본 개시내용과 일치하는 다형 변이체, 종간 동족체 및 대립유전자를 배제하거나 배제하지 않는다. 통상적으로, 서로에 대한 보존적 치환은 1) 알라닌(A), 글라이신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신(K); 5) 아이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Creighton, Proteins (1984)] 참조).

[0473]

폴리펩타이드의 적절한 배좌를 유지시키는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 일반적으로 세린에 의해 또한 치환되어, 분자의 산화적 안정성을 개선하고 비정상 가교결합을 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은 안정성을 개선하거나 올리고머화를 촉진하도록 폴리펩타이드에 첨가될 수 있다.

[0474]

폴리펩타이드를 투여하는 것을 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 치환 및/또는 변형은 단백질분해 분해를 방지하거나 감소시키고/시키거나, 대상체에서 폴리펩타이드의 반감기를 연장시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 이것을 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인, 예컨대, 비제한적인 예로서, 트랜스페린(WO 제06096515A2호), 알부민(Yeh et al., 1992), 성장 호르몬(US2003104578AA); 셀룰로스(Levy and Shoseyov, 2002); 및/또는 Fc 단편(Ashkenazi and Chamow, 1997)에 접합하거나 융합함으로써 변형될 수 있다. 이전 문단에서의 참고문헌은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0475]

폴리펩타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 적어도 하나의 웨타이드 결합 대체를 포함할 수 있다. 단일 웨타이드 결합 또는 다수의 웨타이드 결합, 예를 들어 2개의 결합, 3개의 결합, 4개의 결합, 5개의 결합, 또는 6개 또는 이것 초과의 결합, 또는 모든 웨타이드 결합은 대체될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 단리된 웨타이드는 웨타이드 결합 대체의 하나의 유형 또는 웨타이드 결합 대체의 다수의 유형, 예를 들어 웨타이드 결합 대체의 2 유형, 3 유형, 4 유형, 5 유형, 또는 이것 초과의 유형을 포함할 수 있다. 웨타이드 결합 대체의 비제한적인 예는 우레아, 티오우레아, 카바메이트, 설포닐 우레아, 트라이플루오로에틸아민, 오르토-(아미노알킬)-페닐아세트산, 파라-(아미노알킬)-페닐아세트산, 메타-(아미노알킬)-페닐아세트산, 티오아미드, 테트라졸, 보론산 에스터, 올레핀기 및 이의 유도체를 포함한다.

[0476]

폴리펩타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 살아 있는 유기체에 의해 생성된 폴리펩타이드 및/또는 단백질에서 흔히 발견되는 천연 발생 아미노산, 예를 들어 Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M), Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q), Asp(D), Glu(E), Lys(K), Arg(R) 및 His(H)를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 대안적인 아미노산을 포함할 수 있다. 대안적인 아미노산의 비제한적인 예는 D-아미노산, 베타-아미노산, 호모시스테인, 포스포세린, 포스포트레오닌, 포스포타이로신, 하이드록시프롤린, 감마-카복시글루타메이트; 히푸르산, 옥타하이드로인돌-2-카복실산, 스타틴, 1,2,3,4,-테트라하이드로아이소퀴놀린-3-카복실산, 페니실린아민(3-머캅토-D-발린), 오르니틴, 시트룰린, 알파-메틸-알라닌, 파라-벤조일페닐알라닌, 파라-아미노 페

닐알라닌, p-플루오로페닐알라닌, 페닐글라이신, 프로파길글라이신, 사르코신 및 tert-뷰틸글라이신), 다이아미노뷰티르산, 7-하이드록시-테트라하이드로아이소퀴놀린 카복실산, 나프탈알라닌, 바이페닐알라닌, 사이클로헥실알라닌, 아미노-아이소뷰티르산, 노르발린, 노르류신, tert-류신, 테트라하이드로아이소퀴놀린 카복실산, 피페콜산, 페닐글라이신, 호모페닐알라닌, 사이클로헥실글라이신, 데하이드로류신, 2,2-다이에틸글라이신, 1-아미노-1-사이클로펜탄카복실산, 1-아미노-1-사이클로헥산카복실산, 아미노-벤조산, 아미노-나프토산, 감마-아미노뷰티르산, 다이플루오로페닐알라닌, 니페코트산, 알파-아미노 뷰티르산, 티에닐-알라닌, t-뷰틸글라이신, 트라이플루오로발린; 헥사플루오로류신; 불화 유사체; 아지드 변형된 아미노산; 알킨 변형된 아미노산; 사이아노 변형된 아미노산; 및 이의 유도체를 포함한다.

[0477] 폴리펩타이드를 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 예를 들어 웨타이드를 포함하는 하나 이상의 아미노산에 대한 모이어티의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 1개 이상의 모이어티 문자, 예를 들어 웨타이드마다 1개 이상의 모이어티 문자, 웨타이드마다 2개 이상의 모이어티 문자, 웨타이드마다 5개 이상의 모이어티 문자, 웨타이드마다 10개 이상의 모이어티 문자 또는 웨타이드마다 이것 초과의 모이어티 문자를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 변형 및/또는 모이어티의 하나 이상의 유형, 예를 들어 변형의 1 유형, 변형의 2 유형, 변형의 3 유형 또는 변형의 이것 초과의 유형을 포함할 수 있다. 변형 및/또는 모이어티의 비제한적인 예는 PEG화; 글라이코실화; HES일화; ELP화; 지질화; 아세틸화; 아미드화; 엔드 캡핑 변형; 사이아노기; 인산화; 알부민 및 고리화를 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 말단 캡핑 변형은 N 말단에서의 아세틸화, N 말단 아실화 및 N 말단 폼일화를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 말단 캡핑 변형은 C 말단에서의 아미드화, C 말단 알콜, 알데하이드, 에스터 및 티오에스터 모이어티의 도입을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드의 반감기는 모이어티, 예를 들어 PEG 또는 알부민의 첨가에 의해 증가할 수 있다.

[0478] 폴리펩타이드를 투여하는 것(또는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 투여하는 것)을 수반하는 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 투여되거나 코딩된 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 아미노산 서열 중 하나의 기능성 단편일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "기능성 단편"은 본 명세서에서 하기 기재된 검정에 따라 야생형 기준 폴리펩타이드의 활성의 적어도 50%를 보유하는 웨타이드의 단편 또는 분절이다. 기능성 단편은 본 명세서에 개시된 서열의 보존적 또는 비보존적 치환을 포함할 수 있다.

[0479] 원래의 아미노산 서열의 변경은 당해 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 다수의 기법에 의해 달성될 수 있다. 아미노산 치환은, 원래의 서열의 단편에 대한 결찰을 허용하는 제한 부위에 의해 플랭킹된 변경되는 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에서의 코돈 변화를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 합성함으로써 예를 들어 특정한 위치에서 도입될 수 있다. 결찰 후, 생성된 재구성된 서열은 원하는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 가지는 유사체를 코딩한다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 지시된 부위 특이적 돌연변이유발 절차는 필요한 치환, 결실 또는 삽입에 따라 변경된 특정한 코돈을 가지는 변경된 뉴클레오타이드 서열을 제공하도록 이용될 수 있다. 이러한 변경을 만드는 기법은 문헌[Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981)]; 및 미국 특허 제4,518,584호 및 제4,737,462호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 의해 개시된 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 화학적으로 합성될 수 있고, 돌연변이는 화학적 합성 공정의 일부로서 혼입될 수 있다.

[0480] 본 명세서에 사용된 바대로 "항체"는, 항체를 천연으로 생성하거나, 재조합 DNA 기법에 의해 생성된 임의의 종으로부터 유래하든; 혈청, B 세포, 하이브리도마, 트랜스펙토마, 효모 또는 박테리아로부터 단리되든, IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 문자 또는 항원 특이적 이의 항체 단편(Fab, F(ab')2, Fv, 다이설파이드 연결된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 폐쇄 배좌 다중 특이적 항체, 다이설파이드 연결된 scfv, 다이아바디(이들로 제한되지는 않음) 포함)을 의미한다.

[0481] 본 명세서에 기재된 바와 같은, "항원"은 항체 물질 상의 결합 부위에 의해 결합된 문자이다. 통상적으로, 항원은 항체 리간드에 의해 결합되고, 생체내 항체 반응을 높일 수 있다. 항원은 폴리펩타이드, 단백질, 핵산 또는 다른 문자 또는 이의 부분일 수 있다. 용어 "항원 결정부위"는 항원-결합 문자, 더 특히 문자의 항원-결합 부위에 의해 인식되는 항원 상의 에피토프를 의미한다.

[0482] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체 시약"은 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불

런 가변 도메인 서열을 포함하고 소정의 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 의미한다. 항체 시약은 항체 또는 항체의 항원-결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 항체 시약은 단일클론 항체 또는 단일클론 항체의 항원-결합 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 영역(본 명세서에서 VH라 측약), 및 경쇄(L) 가변 영역(본 명세서에서 VL이라 측약)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 영역 및 2개의 경쇄(L) 가변 영역을 포함한다. 용어 "항체 시약"은 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, 단쇄 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')2, Fd 단편, Fv 단편, scFv, 및 도메인 항체 (dAb) 단편(예를 들어, 문헌[de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26(3):629-39](본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨) 참조), 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(및 아형 및 이들의 조합)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 임의의 소스, 예컨대 마우스, 토끼, 돼지, 랙트 및 영장류(인간 및 비인간 영장류) 및 영장류화 항체 기원일 수 있다. 항체는 또한 미니바디, 인간화된 항체, 키메라 항체 등을 포함한다.

[0483] VH 및 VL 영역은 "프레임워크 영역"("FR")이라 칭하는 더 보존되는 영역에 의해 배치된 "상보성 결정 영역"("CDR")이라 칭하는 과변이의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 영역 및 CDR의 정도는 정확하게 정의된다(문헌[Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917](본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨) 참조). 각각의 VH 및 VL은 통상적으로 아미노 말단으로부터 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다.

[0484] 본 명세서에서 상호교환되어 사용되는, 용어 "항원-결합 단편" 또는 "항원-결합 도메인"은 관심 있는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 전장 항체의 용어 "항원-결합 단편" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 다이설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 또는 VL 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)); 및 (vi) 특이적 항원-결합 기능성을 보유하는 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "특이적 결합"은 2개의 분자, 화합물, 세포 및/또는 입자 사이의 화학적 상호작용을 의미하고, 여기서 제1 집합체는 비표적인 제3 집합체에 결합하는 더 높은 친화도 및 특이성으로 제2의 표적 집합체에 결합한다. 본 명세서에 기재된 모든 양태의 몇몇 실시형태에서, 특이적 결합은 제3의 비표적 집합체에 대한 친화도보다 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000배 또는 이것 초과인 제2 표적 집합체에 대한 제1 집합체의 친화도를 의미할 수 있다.

[0485] 추가로, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 항체는 인간에서의 치료를 위해 기능적 활성을 유지하면서 잠재적인 면역원성을 감소시키도록 추가로 최적화될 수 있다. 이와 관련하여, 기능적 활성을 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 항체 또는 이의 항체 시약과 연관된 하나 이상의 공지된 기능적 활성을 나타낼 수 있는 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 기능적 활성을 예를 들어 표적 분자에 결합하는 능력을 포함한다.

[0486] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열"은, 리보핵산, 데옥시리보핵산 또는 이의 유사체의 단위를 혼입하는, 임의의 분자, 바람직하게는 중합체 분자를 의미한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 가닥 핵산은 변성된 이중 가닥 DNA의 하나의 핵산 가닥일 수 있다. 대안적으로, 이것은 임의의 이중 가닥 DNA로부터 유래하지 않은 단일 가닥 핵산일 수 있다. 일 양태에서, 핵산은 DNA일 수 있다. 또 다른 양태에서, 핵산은 RNA일 수 있다. 적합한 핵산 분자는 DNA, 예컨대 게놈 DNA 또는 cDNA이다. 다른 적합한 핵산 분자는 RNA, 예컨대 mRNA이다.

[0487] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "치료한다", "치료", "치료하는" 또는 "경감"은 치료학적 치료를 의미하고, 여기서 목적은 통증과 같은 질환 또는 장애와 연관된 병태의 중증도 또는 진행을 역전시키거나, 감소시키거나, 경감시키거나, 저해하거나, 느리게 하거나, 중지시키는 것이다. 용어 "치료하는"은 통증과 연관된 병태, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 부작용 또는 증상을 감소시키거나 경감시키는 것을 포함한다. 하나 이상의 증상 또는 임상 마커가 감소하는 경우, 치료는 일반적으로 "효과적"이다. 대안적으로, 질환의 진행이 감소하거나 중지하는 경우, 치료는 "효과적"이다. 즉, "치료"는 증상 또는 마커의 개선뿐만 아니라, 치료의 부재에서 예상되는 것과 비교하여 증상의 진행 또는 악화의 중지 또는 적어도 느려짐을 포함한다. 유익한 또는 원하는 임상 결과는 하나 이상의 증상(들)의 경감, 질환의 정도의 감소, 안정화된(즉, 악화하지 않은) 질환 상태, 질환 진행의 지연 또는 느려짐, 질환 상태의 경감 또는 완화, (부분이든 또는 전체이든) 관해, 및/또는 사망률 감소(검출

가능이든 또는 검출 불가이든)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 용어 질환의 "치료"는 또한 질환의 증상 또는 부작용으로부터의 경감을 제공하는 것(완화성 치료 포함)을 포함한다.

[0488] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "약제학적 조성물"은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어 약제학적 산업에서 흔히 사용되는 담체와 조합되는 활성 물질을 의미한다. 구절 "약제학적으로 허용 가능한"은, 충분한 의학 판단의 범위 내에, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합당한 이익/위험 비에 알맞는 화합물, 재료, 조성물, 및/또는 제형을 의미하도록 본 명세서에서 사용된다.

[0489] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "투여하는"은 원하는 부위에서의 물질의 적어도 부분 전달을 발생시키는 방법 또는 경로에 의해 대상체에 대한 본 명세서에 개시된 바와 같은 화합물의 배치를 의미한다. 본 명세서에 개시된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 대상체에서 효과적인 치료를 발생시키는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0490] 용어 "통계학적으로 유의미한" 또는 "유의미하게"는 통계 유의성을 의미하고, 일반적으로 2의 표준 편차(2SD) 또는 이것 초과의 차이를 의미한다.

[0491] 조작 예 이외에, 또는 다르게 표시되지 않는 경우, 본 명세서에 사용된 성분 또는 반응 조건의 분량을 나타내는 모든 수는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "약"은 백분율과 함께 사용될 때, ±1%를 의미할 수 있다.

[0492] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "포함하는" 또는 "포함한다"는, 방법 또는 조성물에 본질적이지만, 본질적 이든 또는 아니든 기재되지 않은 요소의 포함에 개방적인, 조성물, 방법 및 이의 각각의 성분(들)을 언급하여 사용된다.

[0493] 용어 "이루어진"은 실시형태의 설명에 인용되지 않은 임의의 요소를 배제한 명세서에 기재된 바와 같은 조성물, 방법 및 이의 각각의 성분을 의미한다.

[0494] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "본질적으로 이루어진"은 소정의 실시형태에 필요한 이들 요소를 의미한다. 상기 용어는 그 실시형태의 기본적이고 신규한 또는 기능적 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 요소의 존재를 허용한다.

[0495] 단수 용어 "일", "하나" 및 "이"는, 문맥이 명확히 다르게 표시하지 않는 한, 복수 지시어를 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은, 문맥이 명확히 다르게 표시하지 않는 한, "및"을 포함하도록 의도된다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 개시내용의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기 기재되어 있다. 약어, "예를 들어"는 라틴어 *exempli gratia*로부터 파생되고, 비제한적인 예를 표시하도록 본 명세서에서 사용된다. 따라서, 약어 "예를 들어"는 용어 "예컨대"와 동의어이다.

[0496] 본 명세서에 사용된 바대로, 융합 단백질에 포함된 프로테아제 활성은 진핵생물 세포에서의 외포작용 융합 기관의 하나 이상의 단백질을 절단할 수 있는 모든 비세포독성 프로테아제를 포함한다. 프로테아제는 바람직하게는 박테리아I 프로테아제(또는 이의 단편)이다. 더 바람직하게는, 박테리아 프로테아제는 속 클로스트리듐 또는 나이세리아 스트렙토코커스(예를 들어, 바람직하게는 엔. 고노레아 또는 에스. 뉴모니아)로부터의 클로스트리듐 L 사슬 또는 나이세리아 IgA 프로테아제)로부터 선택된다. 비세포독성 프로테아제의 또 다른 예는 전갈 독 프로테아제, 예컨대 브라질 전갈 티티우스 세룰라투스 또는 프로테아제 안타레아스의 독의 것을 포함한다.

[0497] 프로테아제 활성은 또한, 변이체 프로테아제가 필수 프로테아제 활성을 여전히 나타내는 한, 변이체 비세포독성 프로테아제(즉, 천연 발생 프로테아제 분자의 변이체)의 활성을 포함한다. 예로서, 변이체는 기준 프로테아제 서열과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 또는 적어도 98%의 아미노산 서열 상동성을 가질 수 있다. 따라서, 용어 변이체는 증대된(또는 감소한) 엔도펩티다제 활성을 가지는 비세포독성 프로테아제를 포함하고, BTx/A 돌연변이체 Q161A, E54A 및 K165L의 증가한 Kcat/Km이 여기서 특별히 언급되고, 문헌[Ahmed, S.A. (2008) *Protein J.* DOI 10.1007/s10930-007-9118-8](이 것에 참고로 포함됨)을 참조한다. 용어 단편은, 프로테아제와 관련하여 사용될 때, 통상적으로 기준 프로테아제의 적어도 150개, 바람직하게는 적어도 200개, 더 바람직하게는 적어도 250개, 가장 바람직하게는 적어도 300개의 아미노산 잔기를 가지는 펩타이드를 의미한다. (상기 기재된) TM '단편' 성분에서처럼, 본 발명의 프로테아제 '단편'은 기준 서열에 기초한 변이체 프로테아제의 단편을 포함한다.

[0498] 본 명세서에 기재된 임의의 양태의 일 실시형태에서, 융합 단백질에 포함된 프로테아제 활성은 세린 또는 금속

단백질분해효소 활성(예를 들어, 엔도펩티다제 활성)을 나타낸다. 일 실시형태에서, 프로테아제는 SNARE 단백질(예를 들어, SNAP-25, 시냅토브레빈/VAMP 또는 신탁신)에 특이적이다.

[0499] 신경독소의 프로테아제 도메인, 예를 들어 박테리아 신경독소의 프로테아제 도메인을 특히 언급한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 다양한 양태는 자연에서 발생하는 신경독소 도메인, 및 이러한 천연 발생 신경독소의 재조합으로 제조된 버전의 사용을 포함한다.

[0500] 예시적인 신경독소는 클로스트리디아에 의해 생성되고, 용어 클로스트리듐 신경독소는 씨. 테타니(TTx), 및 씨. 보툴리눔(BTx) 혈청형 A-G에 의해 생성된 신경독소, 및 씨. 바라틸(*C. baratii*) 및 씨. 뷰티리쿰(*C. butyricum*)에 의해 생성된 밀접하게 관련된 BTx 유사 신경독소를 포함한다. 상기 언급된 약어는 본 명세서에 걸쳐 사용된다. 예를 들어, 명명법 BTx/A는 BTx(혈청형 A)로서의 신경독소의 소스를 나타낸다. 상응하는 명명법은 다른 BTx 혈청형에 적용된다.

[0501] BTx는, 혈청형에 따라 0.5 내지 5ng/kg의 범위인 마우스에 대한 평균 치사 용량(LD50) 값으로, 공지된 가장 강력한 독소이다. BTx는 위장관에서 흡수되고, 일반 순환에 진입한 후, 콜린성 신경 말단의 프리시냅스 막에 결합하고, 이의 신경전달물질 아세틸콜린의 방출을 방지한다. BTx/B, BTx/D, BTx/F 및 BTx/G는 시냅토브레빈/소포연관 막 단백질(VAMP)을 절단한다; BTx/C, BTx/A 및 BTx/E는 25kDa의 시냅토솜 연관된 단백질(SNAP-25)을 절단하고; BTx/C는 신탁신을 절단한다.

[0502] BTx는, 약 50kDa의 경쇄(L 사슬)에 단일 다이설파이드 결합에 의해 약 100kDa의 공유로 연결된 중쇄(H 사슬)로 이루어진, 약 150kDa의 이사슬 단백질인, 공통 구조를 공유한다. H 사슬은 각각 약 50kDa인 2개의 도메인으로 이루어진다. 말단 도메인(H_C)은 고친화도 뉴런성 결합에 필요한 한편, N 말단 도메인(H_N)은 막 전위에 관여하는 것으로 제안된다. L 사슬은 기질 SNARE 단백질의 절단을 담당하는 아연 의존적 금속단백질분해효소이다.

[0503] 용어 L 사슬 단편은 L 사슬 of 신경독소의 성분을 의미하고, 이의 단편은 금속단백질분해효소 활성을 나타내고, 세포 외포작용에 관여한 소포 및/또는 혈장 막 연관된 단백질을 단백질분해로 절단할 수 있다.

[0504] 적합한 프로테아제(기준) 서열의 예는 하기를 포함한다:

[0505] 보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(1-448)

[0506] 보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(1-440)

[0507] 보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(1-441)

[0508] 보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(1-445)

[0509] 보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(1-422)

[0510] 보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(1-439)

[0511] 보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(1-441)

[0512] 파상풍 신경독소- 아미노산 잔기(1-457)

[0513] IgA 프로테아제 - 아미노산 잔기(1-959)[Pohlner, J. et al. (1987). Nature 325, pp. 458-462(본 명세서에 참고로 포함됨)].

[0514] 비세포독소 프로테아제를 포함하는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 비세포독소 프로테아제는 본 명세서에 기재된 IgA 프로테아제 또는 안타레아스일 수 있다. 비세포독소 프로테아제를 가지는 본 명세서에 기재된 융합 단백질의 일 실시형태에서, 비세포독소 프로테아제는 하기 페이지에 기재된 고유한 절단 인식서열을 가질 수 있다.

[0515] 경쇄를 포함하는 다양한 클로스트리듐 독소 단편은 본 발명의 양태에서 유용할 수 있고, 단 이들 경쇄 단편은 신경전달물질 방출 기관의 코어 성분을 특이적으로 표적화하고 이에 따라 전체 세포 기전을 실행하는 데 참여할 수 있고, 이로써 클로스트리듐 독소는 기질을 단백질분해로 절단한다. 클로스트리듐 독소의 경쇄는 대략 420개 내지 460개의 아미노산 길이이고, 효소 도메인을 포함한다. 조사는 클로스트리듐 독소 경쇄의 전체 길이가 효소 도메인의 효소 활성에 필요하지 않다는 것을 보여준다. 비제한적인 예로서, BTx/A 경쇄의 처음의 8개의 아미노산은 효소 활성에 필요하지 않다. 또 다른 비제한적인 예로서, TTx 경쇄의 처음의 8개의 아미노산은 효소 활성에 필요하지 않다. 마찬가지로, 경쇄의 카복실 말단은 효소 활성에 필요하지 않다. 비제한적인 예로서, BTx/A

경쇄의 마지막 32개의 아미노산(417-448번 잔기)은 효소 활성에 필요하지 않다. 또 다른 비제한적인 예로서, TTx 경쇄의 마지막 31개의 아미노산(427-457번 잔기)은 효소 활성에 필요하지 않다. 따라서, 이 실시형태의 양태는 예를 들어 적어도 350개의 아미노산, 적어도 375개의 아미노산, 적어도 400개의 아미노산, 적어도 425개의 아미노산 및 적어도 450개의 아미노산의 길이를 가지는 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 경쇄를 포함할 수 있다. 이 실시형태의 다른 양태는 예를 들어 기껏해야 350개의 아미노산, 기껏해야 375개의 아미노산, 기껏해야 400개의 아미노산, 기껏해야 425개의 아미노산 및 기껏해야 450개의 아미노산의 길이를 가지는 효소 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 경쇄를 포함할 수 있다.

- [0516] 적합한 비세포독성 프로테아제의 추가의 예는 WO 제2007/106115호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 자세히 기재되어 있다.
- [0517] 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 비뉴런성 SNARE 단백질, 예컨대 SNAP-23 단백질을 절단한다. 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 SNAP-23을 절단할 수 있는 변형된 보툴리눔 독소 L 사슬이다. 이러한 변형된 L 사슬의 예는 문헌[Chen and Barbieri, PNAS, vol. 106, no. 23, p9180-9184, 2009]에 기재되어 있다.
- [0518] 일 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 BTx/A, BTx/C 또는 BTx/E 프로테아제이고, 바람직한 SNARE 모티프는 SNAP(예를 들어, SNAP 25) 모티프이다.
- [0519] 또 다른 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 BTx/B, BTx/D, BTx/F 또는 BTx/G 또는 파상풍 신경독소(TTx) 프로테아제이고, 바람직한 SNARE 모티프는 VAMP 모티프이다.
- [0520] 또 다른 실시형태에서, 비세포독성 프로테아제는 BTx/C1 프로테아제이고, 바람직한 SNARE 모티프는 신탁신 모티프이다.
- [0521] 본 명세서에 기재된 조작된 융합 단백질의 비세포독성 프로테아제는 상이한 절단 부위 서열을 인식하고, 이에 따라 약간 상이한 절단 특이성을 가진다.

비세포독성 프로테아제	절단 부위 인식 서열:							
	P4-P3-P2-P1-↓-P1'-P2'-P3'							
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	
BTx/A	E	A	N	Q	R	A	T	(서열 번호 71)
BTx/B	G	A	S	Q	F	E	T	(서열 번호 72)
BTx/C	A	N	Q	R	A	T	K	(서열 번호 73)
BTx/C	D	T	K	K	A	V	K	(서열 번호 74)
BTx/D	R	D	Q	K	L	S	E	(서열 번호 75)
BTx/E	Q	I	D	R	I	M	E	(서열 번호 76)
BTx/F	E	R	D	Q	K	L	S	(서열 번호 77)
BTx/G	E	T	S	A	A	K	I	(서열 번호 78)
TTx	G	A	S	Q	F	E	T	(서열 번호 79)
IgA 프로테아제	S	T	P	P	T	P	S	(서열 번호 80)
안타레이아제	I	K	R	K	Y	W	W	(서열 번호 81)

[0522]

[0523] 추가의 예로서, 하기 인식 서열 및 절단 부위를 참조한다:

비세포독성		절단 부위 인식 서열:						
프로테아제		P4-P3-P2-P1-↓-P1' -P2' -P3'						
		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
BTx/A	E	A	N	Q		R	A	T (서열 번호 82)
	A	N	Q	R		A	T	K (서열 번호 83)
	E	A	N	Q		R	A	T (서열 번호 84)
	F	A	N	Q		R	A	T (서열 번호 85)
	E	A	N	Q		R	A	T (서열 번호 86)
	E	A	N	Q		R	A	I (서열 번호 87)
	E	A	N	K		A	T	K (서열 번호 88)
	E	A	N	K		H	A	T (서열 번호 89)
	E	A	N	K		H	A	N (서열 번호 90)
	Q			R				
BTx/C	K			H				
	D	E	A	N		Q	R	A (서열 번호 91)
	E	A	N	Q		R	A	T (서열 번호 92)
	A	N	Q	R		A	T	K (서열 번호 93)
	N	Q	R	A		T	K	M (서열 번호 94)
	A	N	Q	R		A	I	K (서열 번호 95)
	A	N	Q	R		A	H	Q (서열 번호 96)
	D	T	K	K		A	V	K (서열 번호 97)
	K	T	K	K		A	V	K (서열 번호 98)
	E	T	K	K		A	I	K (서열 번호 99)
	E	T	K	R		A	M	K (서열 번호 100)
	D	T	K	K		A	V	R (서열 번호 101)
	D	T	K	K		A	L	K (서열 번호 102)
	D	T	K	K		A	M	K (서열 번호 103)
	E	S	K	K		A	V	K (서열 번호 104)
	E	T	K	K		A	M	K (서열 번호 105)

[0524]

	E	T	K	K	A	V	K (서열 번호 106)
				K		A	
				R		A	
BTx/E	Q	I	D	R	I	M	E (서열 번호 107)
	Q	I	Q	K	I	T	E (서열 번호 108)
	Q	I	D	R	I	V	E (서열 번호 109)
	Q	F	D	R	I	M	D (서열 번호 110)
	Q	F	D	R	I	M	E (서열 번호 111)
	Q	L	D	R	I	H	D (서열 번호 112)
	Q	I	D	R	I	M	D (서열 번호 113)
	Q	V	D	R	I	Q	Q (서열 번호 114)
				R		I	
				K		I	
BTx/B	G	A	S	Q	F	E	T (서열 번호 115)
	A	G	A	S	Q	F	E (서열 번호 116)
	G	A	S	Q	F	E	S (서열 번호 117)
	Q	A	S	Q	F	E	S (서열 번호 118)
	G	A	S	Q	G	E	T (서열 번호 119)
	G	A	S	Q	F	E	Q (서열 번호 120)
	Q	A	S	Q	F	E	A (서열 번호 121)
	G	A	S	Q	F	Q	Q (서열 번호 122)
	G	A	S	Q	F	E	A (서열 번호 123)
				Q		F	
BTx/D	R	D	Q	K	L	S	E (서열 번호 124)
	R	D	Q	K	I	S	E (서열 번호 125)
	K	D	Q	K	L	A	E (서열 번호 126)
				K		L	

BTx/F	E	R	D	Q	K	L	S (서열 번호 127)
	V	L	E	R	D	Q	K (서열 번호 128)
	E	R	D	Q	K	I	S (서열 번호 129)
	E	R	D	Q	A	L	S (서열 번호 130)
	E	K	D	Q	K	L	A (서열 번호 131)
				Q		K	
BTx/G	E	S	S	A	A	K	I (서열 번호 132)
	E	T	S	A	A	K	I (서열 번호 133)
	E	S	S	A	A	K	L (서열 번호 134)
	E	T	S	A	A	K	L (서열 번호 135)
				A		A	
TTx	G	A	S	Q	F	E	T (서열 번호 136)
	G	A	S	Q	G	E	T (서열 번호 137)
	G	A	S	Q	F	E	Q (서열 번호 138)
	Q	A	S	Q	F	E	A (서열 번호 139)
	G	A	S	Q	F	E	S (서열 번호 140)
	Q	A	S	Q	F	E	S (서열 번호 141)
	G	A	S	Q	F	Q	Q (서열 번호 142)
	G	A	S	Q	F	E	A (서열 번호 143)
				Q		F	
IgA 프로테아제	S	T	P	P	T	P	S (서열 번호 144)
안타레아제	I	K	R	K	Y	W	W (서열 번호 145)

[0526]

표적화 모이어티(TM)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 융합 폴리펩타이드와 표적 세포의 표면 사이의 물리적 회합을 발생시키도록 결합 부위와 기능상 상호작용하는 임의의 화학적 구조를 의미한다. 본 발명의 맥락에서, 표적 세포는 통각수용체 뉴런이다. 용어 TM은 표적 세포 상의 결합 부위에 결합할 수 있는, 임의의 문자(즉, 천연 발생 문자, 또는 화학적으로/물리적으로 변형된 이의 변이체)를 포함하고, 이 결합 부위는 내재화(예를 들어, 엔도솜 형성)(또한 수용체 매개된 내포작용이라고도 칭함)할 수 있다. TM은 엔도솜 막 전위 기능을 보유할 수 있고, 이 경우에 별개의 TM 및 전위 도메인 성분은 본 발명의 물질에 존재할 필요가 없다. 이전의 설명을 걸쳐, 특정한 TM이 기재되어 있다. TM의 언급은 단지 예시적이고, 본 발명은 예시된 TM의 기본적인 결합(즉, 표적화) 능력을 보유하는 모든 변이체 및 이의 유도체를 포함한다.

[0528]

본 발명에 따른 TM은 항체(예를 들어, 항체 단편) 및 결합 스캐폴드; 특히 표적 세포에 (예를 들어, 특이적으로) 결합할 목적을 위해 설계된 상업적으로 구입 가능한 항체/ 단편 및 스캐폴드를 포함한다.

[0529]

단백질 스캐폴드는 치료학적 단일클론 항체 및 유도체, 예컨대 scFvs, Fab 분자, dAbs(단일 도메인 항체), 카멜리드, 다이아바디 및 미니바디(이들의 각각은 본 발명의 TM으로서 사용될 수 있음)의 확장되는 레퍼토리를 보완하도록 보편적 결합 프레임워크의 새로운 생성을 나타낸다. 스캐폴드 시스템은 신규한 스캐폴드의 생성 또는 공지된 단백질 결합 도메인의 변형을 통해 공지된 단백질 인식 도메인을 생성하거나 변형시킨다. 이러한 스캐폴드

는 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다:

- [0530] (i) 단백질 A 기반 스캐폴드 - 아피바디(Nord, K. et al 1997 "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain". Nat Biotechnol 15, 772-777);
- [0531] (ii) 리포칼린 기반 스캐폴드 - 안티칼린(Skerra 2008 "Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities". FEBS J. 275:2677-83);
- [0532] (iii) 피브로넥틴 기반 스캐폴드 - 아드넥틴(Dineen et al 2008 "The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumour burden in an orthotropic mouse model of pancreatic cancer". BMC Cancer 8:352);
- [0533] (iv) 아비머(Silverman et al 2005 "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". Nat Biotechnol 23:1556-61);
- [0534] (v) 안키린 기반 스캐폴드 - 달핀(darpin)(Zahnd et al 2006 "Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins". J Biol Chem. 281:35167-75); 및
- [0535] (vi) CDR에 유사한 루프를 가지는 Ig 도메인에 상당한 구조적 상동성을 가지는 단백질 폴드에 기초한 센티린 스캐폴드. Ig 도메인은 인간 단백질에서 공통 모듈이고, 대안적인 스캐폴드 단백질로서 널리 적용된다. 상기 '스캐폴드' 공보의 각각은 참고로 (그 전문이) 여기에 포함된다.
- [0536] 결합 스캐폴드는 특이적 세포 표면 단백질, 수용체 또는 다른 세포 표면 에피토프, 예컨대 당 기와의 상호작용을 통해 특정한 세포형을 표적화하도록 사용될 수 있다. 이러한 변형된 스캐폴드는 본 발명의 재조합 비세포독성 프로테아제 기반 폴리펩타이드로 조작될 수 있다.
- [0537] 본 발명의 TM은 해당 통각수용체 뉴런 표적 세포에 결합한다(바람직하게는 특이적으로 결합한다). 용어 "특이적으로 결합한다"는 바람직하게는 소정의 TM이 10^6 M^{-1} 이상, 바람직하게는 10^7 M^{-1} 이상, 더 바람직하게는 10^8 M^{-1} 이상, 가장 바람직하게는, 10^9 M^{-1} 이상의 결합 친화도(Ka)로 표적 세포에 결합한다는 것을 의미한다. 용어 "특이적으로 결합한다"는 소정의 TM이 10^6 M^{-1} 이상, 바람직하게는 10^7 M^{-1} 이상, 더 바람직하게는 10^8 M^{-1} 이상, 가장 바람직하게는, 10^9 M^{-1} 이상의 결합 친화도(Ka)로 소정의 수용체, 예를 들어 통각수용체에서 발견되는 ANTXR2 또는 NGFR, 또는 Nav1.7. 1.8 및 1.9 이온 채널에 결합한다는 것을 또한 의미할 수 있다.
- [0538] 본 명세서의 TM의 언급은 해당 표적 세포에 결합하는 능력을 보유하는 이의 단편 및 변이체를 포함한다. 예로서, 변이체는 기준 TM과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 97 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 가질 수 있다(예를 들어, TM을 정의하는 본 명세서에 제시된 임의의 서열 번호). 따라서, 변이체는 하나 이상의 아미노산의 유사체(예를 들어, 비천연 아미노산), 또는 치환된 연결을 포함할 수 있다. 또한, 예로서, 용어 단편은, TM과 관련하여 사용될 때, 기준 TM의 적어도 10개, 바람직하게는 적어도 20개, 더 바람직하게는 적어도 30개, 가장 바람직하게는 적어도 40개의 아미노산 잔기를 가지는 웹타이드를 의미한다. 용어 단편은 또한 상기 언급된 변이체를 의미한다. 따라서, 예로서, 본 발명의 단편은 웹타이드 서열이 기준 웹타이드의 아미노산의(인접한 아미노산의) 상응하는 웹타이드 서열에 비해 적어도 80%의 서열 상동성을 가지는 적어도 10개, 20개, 30개 또는 40개 아미노산을 가지는 웹타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0539] TM이 선택된 표적 세포에 결합한다는 것을 확인하는 것이 일상적이다. 예를 들어, 해당 표적 세포를 대표하는 조직 또는 세포가 과도한 비표지된 TM의 존재 하에 표지된(예를 들어, 삼중수소화) TM에 노출되는 단순한 방사능 대체 실험을 이용할 수 있다. 이러한 실험에서, 비특이적 및 특이적 결합의 상대 비율이 평가될 수 있어서, TM이 표적 세포에 결합한다는 확인을 허용한다. 임의로, 검정은 하나 이상의 결합 길항제를 포함할 수 있고, 검정은 TM 결합의 소실을 관찰하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 유형의 실험의 예는 문헌[Hulme, E.C. (1990), Receptor-binding studies, a brief outline, pp. 303-311, In Receptor biochemistry, A Practical Approach, Ed. E.C. Hulme, Oxford University Press]에서 발견될 수 있다.
- [0540] 본 발명의 맥락에서, 웹타이드 TM의 언급은 유사체가 상응하는 '기준' TM과 동일한 수용체에 결합하는 한, 이의 웹타이드 유사체를 포함한다.

- [0541] 본 명세서에 기재된 융합 단백질(본 명세서에서 폴리펩타이드라고도 칭함)은 클로스트리듐 신경독소의 기능성 HC (중쇄) 또는 H_c 도메인(HC의 C 말단 모이어티)이 결여될 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 클로스트리듐 신경독소 홀로톡신의 마지막 50개의 C 말단 아미노산이 결여된다. 또 다른 실시형태에서, 폴리펩타이드는 클로스트리듐 신경독소 홀로톡신의 마지막 100개, 150개, 200개, 250개 또는 300개의 C 말단 아미노산 잔기가 결여된다. 대안적으로, HC 결합 활성은 돌연변이유발에 의해 무효/감소될 수 있고, 예로서, 편의를 위해 BTx/A를 언급시, 강글리오사이드 결합 포켓에서의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기 돌연변이(L로의 W1266 및 F로의 Y1267)의 변형은 HC 영역이 이의 수용체 결합 기능을 소실하게 한다. 비혈청형 A 클로스트리듐 웨타이드 성분, 예를 들어 돌연변이를 가지는 보툴리눔 B(L로의 W1262 및 F로의 Y1263) 또는 보툴리눔 E(L로의 W1224 및 F로의 Y1225)에 기초한 작제물에 상사 돌연변이가 이루어질 수 있다. 활성 부위에 대한 다른 돌연변이는 보툴리눔 유형 A 독소에서의 Y1267S 및 다른 클로스트리듐 신경독소에서의 상응하는 고도로 보존된 잔기와 같은 HC 수용체 결합 활성의 동일한 제거를 달성한다. 이를 및 다른 돌연변이의 상세내용은 문헌[Rummel et al (2004) (Molecular Microbiol. 51:631-634)](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0542] 네이티브 클로스트리듐 신경독소의 HC 웨타이드는 대략 400개 내지 440개의 아미노산 잔기를 포함하고, 각각 대략 25kDa의 2개의 기능상 구별되는 도메인, 즉 N 말단 영역(흔히 H_N 웨타이드 또는 도메인이라 칭함) 및 C 말단 영역(흔히 H_c 웨타이드 또는 도메인이라 칭함)으로 이루어진다. 더구나, C 말단 160-200 아미노산 잔기를 구성하는 C 말단 영역(H_c)이 이의 천연 세포 수용체, 즉 신경근 접합부에서의 신경 말단에 대한 클로스트리듐 신경독소의 결합을 책임진다는 것이 널리 입증되었다. 따라서, 본 명세서에 걸쳐, 네이티브 클로스트리듐 신경독소가 결합하는 세포 표면 수용체에 클로스트리듐 중쇄가 결합할 수 없도록, 기능성 중쇄 HC 웨타이드(또는 도메인)가 결여된 클로스트리듐 중쇄의 언급은 클로스트리듐 중쇄가 단순히 기능성 H_c 웨타이드가 결여된다는 것을 의미한다. 즉, H_c 웨타이드 영역은 부분적으로 또는 전부 결실되거나, 그렇지 않으면 (예를 들어, 종래의 화학적 또는 단백질분해 치료를 통해) 변형되어서 신경근 접합부에서의 신경 말단에 대한 이의 네이티브 결합 능력을 불활성화한다.
- [0543] 따라서, 일 실시형태에서, 클로스트리듐 H_N 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소의 C 말단 웨타이드 부분(H_c)의 일부가 결여되고, 이에 따라 네이티브 클로스트리듐 신경독소의 HC 결합 기능이 결여된다. 예로서, 일 실시형태에서, C 말단으로 연장된 클로스트리듐 H_N 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소 중쇄의 C 말단 40개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 60개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 80개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 100개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 120개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 140개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 150개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 160개 아미노산 잔기가 결여된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 클로스트리듐 H_N 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소의 전체 C 말단 웨타이드 부분(H_c)이 결여되고, 이에 따라 네이티브 클로스트리듐 신경독소의 HC 결합 부분이 결여된다. 예로서, 일 실시형태에서, 클로스트리듐 H_N 웨타이드는 클로스트리듐 신경독소 중쇄의 C 말단 165개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 170개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 175개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 180개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 185개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 190개 아미노산 잔기, 또는 C 말단 195개 아미노산 잔기가 결여된다. 추가의 예로서, 본 발명의 클로스트리듐 H_N 웨타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 클로스트리듐 H_c 기준 서열이 결여된다:
- [0544] 보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1111-L1296)
- [0545] 보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1098-E1291)
- [0546] 보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1112-E1291)
- [0547] 보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1099-E1276)
- [0548] 보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1086-K1252)
- [0549] 보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1106-E1274)
- [0550] 보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1106-E1297)
- [0551] 파상풍 신경독소 - 아미노산 잔기(Y1128-D1315).
- [0552] 전위 도메인은 프로테아제 활성의 기능적 발현이 표적 세포의 시토졸 내에 발생하도록 표적 세포로의 프로테아제 활성이 표적 세포로의 전위 도메인은 프로테아제 활성의 기능적 발현이 표적 세포의 시토졸 내에 발생하도록 표적 세포로의

제의 전위가 가능하게 하는 문자 또는 단백질 도메인이다. 임의의 문자(예를 들어, 단백질 또는 웹타이드)가 본 발명의 필수 전위 기능을 보유하는지는 다수의 종래의 검정 중 임의의 하나에 의해 확인될 수 있다.

[0553] 예를 들어, Shone C.(1987)는 시험 분자에 의해 시험도전된 리포솜을 이용하는 시험관내 검정을 기재한다. 필수 전위 기능의 존재는 K⁺ 및/또는 표지된 NAD의 리포솜로부터의 방출에 의해 확인되고, 이는 용이하게 모니터링될 수 있다[문헌[Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167(1): pp. 175-180] 참조].

[0554] 추가의 예는 Blaustein R.(1987)에 의해 제공되고, 이것은 평면 인지질 이층 막을 사용하는 단순한 시험관내 검정을 기재한다. 막은 시험 분자에 의해 시험도전되고, 필수 전위 기능은 막에 걸친 전도도의 증가에 의해 확인된다[문헌[Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, no. 1: pp. 115-120] 참조].

[0555] 막 융합의 평가 및 이에 따른 본 발명에서 사용하기에 적합한 전위 도메인의 확인이 가능하게 하는 추가 방법론은 문헌[Methods in Enzymology Vol 220 and 221, Membrane Fusion Techniques, Parts A and B, Academic Press 1993]에 의해 제공된다.

[0556] 본 발명은 또한, 변이체 도메인이 필수 전위 활성을 여전히 나타내는 한, 변이체 전위 도메인을 포함한다. 예로서, 변이체는 기준 전위 도메인과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95% 또는 적어도 98%의 아미노산 서열 상동성을 가질 수 있다. 용어 단편은, 전위 도메인과 관련하여 사용될 때, 기준 전위 도메인의 적어도 20개, 바람직하게는 적어도 40개, 더 바람직하게는 적어도 80개, 가장 바람직하게는 적어도 100개의 아미노산 잔기를 가지는 웹타이드를 의미한다. 클로스트리듐 전위 도메인의 경우에, 단편은 바람직하게는 기준 전위 도메인(예를 들어, H_N 도메인)의 적어도 100개, 바람직하게는 적어도 150개, 더 바람직하게는 적어도 200개, 가장 바람직하게는 적어도 250개의 아미노산 잔기를 갖는다. (상기 기재된) TM '단편' 성분에 의해, 본 발명의 전위 '단편'은 기준 서열에 기초한 변이체 전위 도메인의 단편을 포함한다.

[0557] 전위 도메인은 바람직하게는 낮은 pH의 조건 하에 지질 막에서 이온 투과성 기공을 형성할 수 있다. 바람직하게는, 엔도솜 막 내에 기공 형성할 수 있는 단백질 분자의 이 부분을 오직 사용하는 것이 발견되었다.

[0558] 전위 도메인은 미생물 단백질 소스, 특히 박테리아 또는 바이러스 단백질 소스로부터 얻어질 수 있다. 그러므로, 일 실시형태에서, 전위 도메인은 예컨대 박테리아 독소 또는 바이러스 단백질과 같은 효소의 전위 도메인이다.

[0559] 박테리아 독소 분자의 소정의 도메인이 이러한 기공을 형성할 수 있다는 것이 널리 입증되었다. 바이러스로 발현된 막 융합 단백질의 소정의 전위 도메인이 이러한 기공을 형성할 수 있다는 것이 또한 공지되어 있다. 이러한 도메인은 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0560] 전위 도메인은 클로스트리듐 기원, 예컨대 H_N 도메인(또는 이의 기능성 성분)일 수 있다. H_N은 H 사슬의 아미노 말단 절반에 대략 동일한 클로스트리듐 신경독소의 H 사슬의 부분 또는 단편, 또는 온전한 H 사슬에서의 그 단편에 상응하는 도메인을 의미한다. 이와 관련하여, HC 세포 결합 기능을 제거하는 것이 요망되어야 하고, 이것은 (뉴클레아제 또는 프로테아제 치료에 의한 DNA 합성 수준, 또는 합성 후 수준에서) HC 또는 H_C 아미노산 서열의 결실에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, HC 기능은 화학적 또는 생물학적 치료에 의해 불활성화될 수 있다.

[0561] 적합한 (기준) 전위 도메인의 예는 하기를 포함한다:

[0562] 보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(449-871)

[0563] 보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(441-858)

[0564] 보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(442-866)

[0565] 보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(446-862)

[0566] 보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(423-845)

[0567] 보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(440-864)

[0568] 보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(442-863)

[0569] 파상풍 신경독소- 아미노산 잔기(458-879)

- [0570] 하위 헬청형에 따른 약간의 변이가 발생할 수 있으므로, 상기 확인된 기준 서열은 가이드로서 생각되어야 한다. 예로서, US 제2007/0166332호(본 명세서에 참고로 포함됨)는 약간 상이한 클로스트리듐 서열을 예로 듈다:
- [0571] 보툴리늄 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(A449-K871)
- [0572] 보툴리늄 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(A442-S858)
- [0573] 보툴리늄 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(T450-N866)
- [0574] 보툴리늄 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(D446-N862)
- [0575] 보툴리늄 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(K423-K845)
- [0576] 보툴리늄 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(A440-K864)
- [0577] 보툴리늄 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(S447-S863)
- [0578] 파상풍 신경독소 - 아미노산 잔기(S458-V879)
- [0579] 적합한 전위 도메인의 추가의 예는 WO 제2007/106115호(본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 자세히 기재되어 있다.
- [0580] 본 발명의 맥락에서, 전위 도메인을 포함하는 다양한 클로스트리듐 독소 H_N 영역은 본 발명의 양태에서 유용할 수 있고, 단 이들 활성 단편은 세포내 소포로부터 표적 세포의 세포질로의 비세포독성 프로테아제(예를 들어, 클로스트리듐 L 사슬)의 방출을 수월하게 하고, 이에 따라 전체 세포 기전을 실행하는 데 참여할 수 있고, 이로써 클로스트리듐 독소는 기질을 단백질분해로 절단한다. 클로스트리듐 독소의 중쇄로부터의 H_N 영역은 대략 410 개 내지 430개의 아미노산 길이이고, 전위 도메인을 포함한다. 조사는 클로스트리듐 독소 중쇄로부터의 H_N 영역의 전체 길이가 전위 도메인의 전위 활성에 필요하지 않다는 것을 보여준다. 따라서, 실시형태는 예를 들어 적어도 350개의 아미노산, 적어도 375개의 아미노산, 적어도 400개의 아미노산 및 적어도 425개의 아미노산의 길이를 가지는 전위 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 H_N 영역을 포함할 수 있다. 다른 실시형태는 예를 들어 기껏해야 350개의 아미노산, 기껏해야 375개의 아미노산, 기껏해야 400개의 아미노산 및 기껏해야 425개의 아미노산의 길이를 가지는 전위 도메인을 포함하는 클로스트리듐 독소 H_N 영역을 포함할 수 있다.
- [0581] 클로스트리듐 보툴리늄 및 씨. 테타니에서의 독소 생성의 유전적 기반에 대한 추가의 상세함을 위해, 본 발명자들은 문헌[Henderson et al (1997) in The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Academic press]을 참고한다.
- [0582] 용어 H_N 은 천연 발생 신경독소 H_N 부분 및, 변형된 H_N 부분이 여전히 상기 언급된 전위 기능을 나타내는 한, 천연 및/또는 합성 아미노산 잔기에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 가지는 변형된 H_N 부분을 포함한다.
- [0583] 대안적으로, 전위 도메인은 비클로스트리듐 기원일 수 있다. 비클로스트리듐 전위 도메인 기원의 예는 디프테리아 독소의 전위 도메인[0=Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1992) 89, 6202-6206; Silverman et al., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524-22532; and London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pp.25-51], 슈도모나스 외독소 유형 A의 전위 도메인[Prior et al. Biochemistry (1992) 31, 3555-3559], 탄저병 독소의 전위 도메인[Blanke et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996) 93, 8437-8442], 전위 기능의 다양한 융합유도 또는 소수성 웨타이드[Plank et al. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918-12924; 및 Wagner et al (1992) PNAS, 89, pp.7934-7938], 및 양친매성 웨타이드[Murata et al (1992) Biochem., 31, pp.1986-1992]를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 전위 도메인은 천연 발생 단백질에 존재하는 전위 도메인을 반영할 수 있거나, 아미노산 변이가 전위 도메인의 전위 기능을 파괴하지 않는 한, 아미노산 변이를 포함할 수 있다.
- [0584] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에서 사용하기에 적합한 바이러스 전위 도메인의 특정한 예는 바이러스로 발현된 막 융합 단백질의 소정의 전위 도메인을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wagner et al. (1992) and Murata et al. (1992)]은 인플루엔자 바이러스 혈구응집소의 N 말단 영역으로부터 유래한 다수의 융합유도 및 양친매성 웨타이드의 전위(즉, 막 융합 및 소포형성) 기능을 기재한다. 원하는 전위 활성을 가지는 것으로 공지된 다른 바이러스로 발현된 막 융합 단백질은 셈리키 포레스트 바이러스(SFV)의 융합유도 웨타이드의 전위 도메인, 소포성 스토마티티스 바이러스(VSV) 당단백질 G의 전위 도메인, SER 바이러스 F 단백질의 전위 도메인 및 포미(Foamy) 바이러스 외피 당단백질의 전위 도메인이다. 바이러스로 코딩된 아스파이크(Aspike) 단백질, 예를 들어 SFV의

E1 단백질 및 VSV의 G 단백질의 G 단백질은 본 발명의 맥락에서 특정한 적용을 가진다.

[0585] 표 2(하기)에 기재된 전위 도메인의 사용은 이의 서열 변이체의 사용을 포함한다. 변이체는 하나 이상의 보존적 핵산 치환 및/또는 핵산 결실 또는 삽입을 포함할 수 있고, 단 변이체는 필수 전위 기능을 보유한다. 변이체는 또한, 변이체가 필수 전위 기능을 보유하는 한, 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 아미노산 결실 또는 삽입을 포함할 수 있다.

표 2

전위 도메인 소스	아미노산 잔기	참고문헌
디프테리아 독소	194-380	<i>Silverman et al.</i> , 1994, <i>J. Biol. Chem.</i> 269, 22524-22532 <i>London E.</i> , 1992, <i>Biochem. Biophys. Acta.</i> , 1113, 25-51
슈도모나스 외독소의 도메인 II	405-613	<i>Prior et al.</i> , 1992, <i>Biochemistry</i> 31, 3555-3559 <i>Kihara & Pastan</i> , 1994, <i>Bioconj. Chem.</i> 5, 532-538
인플루엔자 바이러스 혈구응집소	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG, 및 이의 변이체	<i>Plank et al.</i> , 1994, <i>J. Biol. Chem.</i> 269, 12918-12924 <i>Wagner et al.</i> , 1992, <i>PNAS</i> , 89, 7934-7938 <i>Murata et al.</i> , 1992, <i>Biochemistry</i> 31, 1986-1992
셈리키 포레스트 바이러스 용합유도 단백질	전위 도메인	<i>Kielian et al.</i> , 1996, <i>J Cell Biol.</i> 134(4), 863-872
수포성 구내염 바이러스 당단백질 G	118-139	<i>Yao et al.</i> , 2003, <i>Virology</i> 310(2), 319-332
SER 바이러스 F 단백질	전위 도메인	<i>Seth et al.</i> , 2003, <i>J Virol.</i> 77(11) 6520-6527
거품형성 바이러스 외투 당단백질	전위 도메인	<i>Picard-Maureau et al.</i> , 2003, <i>J Virol.</i> 77(8), 4722-4730

[0586]

[0587] 본 명세서에 기재된 조성물의 폴리펩타이드 및 방법은 전위 촉진 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 이 도메인은 표적 세포의 시토졸로의 비세포독성 프로테아제의 전달을 수월하게 하고, 예를 들어 WO 제08/008803호 및 WO 제08/008805호(이들은 각각 여기에 본 명세서에서 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0588] 예로서, 적합한 전위 촉진 도메인은 외피형 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인을 포함하고, 예를 들어 적합한 용합유도 웨პ타이드 도메인은 인플루엔자 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 23개의 아미노산의 인플루엔자 A 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인), 알파바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 26개의 아미노산의 셈리키 포레스트 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인), 베시콜로바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 21개의 아미노산의 소포성 스토마티티스 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인), 레스피로바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 25개의 아미노산의 센다이 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인), 모르빌리바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 25개의 아미노산의 개 디스템퍼 바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인), 아불라바이러스 용합유도 웨პ타이드 도메인(예를 들어, 25개의 아미노산의 뉴캐슬 질환 바이러스 용합

유도 웹타이드 도메인), 헤니파바이러스 융합유도 웹타이드 도메인(예를 들어, 25개의 아미노산의 헨드라 바이러스 융합유도 웹타이드 도메인), 메타뉴모바이러스 융합유도 웹타이드 도메인(예를 들어, 25개의 아미노산의 인간 메타뉴모바이러스 융합유도 웹타이드 도메인) 또는 스푸마바이러스 융합유도 웹타이드 도메인, 예컨대 유인원 포미 바이러스 융합유도 웹타이드 도메인; 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0589] 추가의 예로서, 전위 촉진 도메인은 클로스트리듐 독소 H_N 도메인 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다. 더 자세히, 클로스트리듐 독소 H_N 전위 촉진 도메인은 적어도 200개의 아미노산, 적어도 225개의 아미노산, 적어도 250개의 아미노산, 적어도 275개의 아미노산의 길이를 가질 수 있다. 이와 관련하여, 클로스트리듐 독소 H_N 전위 촉진 도메인은 바람직하게는 기껏해야 200개의 아미노산, 기껏해야 225개의 아미노산, 기껏해야 250개의 아미노산, 또는 기껏해야 275개의 아미노산의 길이를 가진다. 특정한 예는 하기를 포함한다:

보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(872-1110)

보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(859-1097)

보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(867-1111)

보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(863-1098)

보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(846-1085)

보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(865-1105)

보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(864-1105)

파상풍 신경독소 - 아미노산 잔기(880-1127)

[0598] 상기 서열 위치는 혈청형/아형에 따라 약간 변할 수 있고, 적합한 (기준) 클로스트리듐 독소 H_N 도메인의 추가의 예는 하기를 포함한다:

보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(874-1110)

보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(861-1097)

보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(869-1111)

보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(865-1098)

보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(848-1085)

보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(867-1105)

보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(866-1105)

파상풍 신경독소- 아미노산 잔기(882-1127)

[0607] 임의의 상기 기재된 촉진 도메인은 본 발명에서 사용하기에 적합한 임의의 이전에 기재된 전위 도메인 웹타이드와 조합될 수 있다. 따라서, 예로서, 비클로스트리듐 촉진 도메인은 비클로스트리듐 전위 도메인 웹타이드 또는 클로스트리듐 전위 도메인 웹타이드와 조합될 수 있다. 대안적으로, 클로스트리듐 독소 H_N 전위 촉진 도메인은 비클로스트리듐 전위 도메인 웹타이드와 조합될 수 있다. 대안적으로, 클로스트리듐 독소 H_N 촉진 도메인은 클로스트리듐 전위 도메인 웹타이드와 조합될 수 있고, 이의 예는 하기를 포함한다:

보툴리눔 유형 A 신경독소 - 아미노산 잔기(449-1110)

보툴리눔 유형 B 신경독소 - 아미노산 잔기(442-1097)

보툴리눔 유형 C 신경독소 - 아미노산 잔기(450-1111)

보툴리눔 유형 D 신경독소 - 아미노산 잔기(446-1098)

보툴리눔 유형 E 신경독소 - 아미노산 잔기(423-1085)

보툴리눔 유형 F 신경독소 - 아미노산 잔기(440-1105)

- [0614] 보툴리눔 유형 G 신경독소 - 아미노산 잔기(447-1105)
- [0615] 파상풍 신경독소 - 아미노산 잔기(458-1127)
- [0616] 상기 확인된 기준 서열은 약간의 변형이 하위혈청형에 따라 발생할 수 있으므로 가이드로서 생각되어야 한다.
- [0617] 서열 상동성
- [0618] 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 제한 없이, 글로벌 방법, 국소 방법 및 하이브리드 방법, 예를 들어 분절 접근법 방법을 포함하는 임의의 다양한 서열 정렬 방법이 이용될 수 있다. 퍼센트 동일성을 결정하기 위한 프로토콜은 당해 분야의 숙련자의 범위 내에 일상적 절차이다. 글로벌 방법은 문자의 끝으로 시작하여 서열을 정렬하고, 개별 잔기 쌍의 점수를 합하고 갭 패널티를 매겨서 최고의 정렬을 결정한다. 비제한적인 방법은 예를 들어 CLUSTAL W를 포함하고, 예를 들어 문헌[Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); and iterative refinement]을 참조하고, 예를 들어 문헌[Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996)]을 참조한다. 국소 방법은 모든 입력된 서열이 공유하는 하나 이상의 보존적 모티프를 확인함으로써 서열을 정렬한다. 비제한적인 방법은 예를 들어 Match-box를 포함하고, 예를 들어 문헌[Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501 -509 (1992); Gibbs sampling, see, e.g., C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, see, e.g., Ivo Van Walle et al., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004)]을 참조한다.
- [0619] 따라서, 퍼센트 서열 동일성은 종래의 방법에 의해 결정된다. 예를 들어, 문헌[Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992]을 참조한다. 간단히 말하면, 10의 갭 오프닝 패널티, 1의 갭 연장 패널티 및 하기 표시된 바와 같은 (하기) Henikoff 및 Henikoff의 "blosum 62" 스코어링 매트릭스(아미노산은 표준 1차자 코드에 의해 표시됨)를 이용하여 정렬 스코어를 최적화하도록 2개의 아미노산 서열을 정렬한다.

[0620] 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬 스코어

A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

[0621]

[0622]

이후, 퍼센트 동일성은 하기로서 계산된다:

동일한 매치의 전체 수

× 100

[더 긴 서열의 길이 + 2 개의 서열을 정렬시키기 위한
더 긴 서열로 도입된 갭의 수]

[0623]

[0624]

실질적으로 상동성 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 가지는 것을 특징으로 한다. 이를 변화는 바람직하게는 작은 성질이고, 즉 보존적 아미노산 치환(하기 참조) 및 폴리펩타이드의 폴딩 또는 활성에 상당히 영향을 미치지 않는 다른 치환; 통상적으로 1개 내지 약 30개의 아미노산의 작은 결실; 및 작은 아미노 또는 카복실 말단 연장, 예컨대 아미노 말단 메티오닌 잔기, 약 20개 내지 25개까지의 잔기의 작은 링커 웹타이드, 또는 친화도 태그이다.

[0625]

보존적 아미노산 치환

[0626]

염기성: 아르기닌

[0627]

라이신

[0628]	히스티딘
[0629]	산성: 글루탐산
[0630]	아스파르트산
[0631]	극성: 글루타민
[0632]	아스파라긴
[0633]	소수성: 류신
[0634]	아이소류신
[0635]	발린
[0636]	*
[0637]	*방향족: 페닐알라닌
[0638]	트립토판
[0639]	타이로신
[0640]	소형: 글라이신
[0641]	알라닌
[0642]	세린
[0643]	트레오닌
[0644]	메티오닌
[0645]	20개의 표준 아미노산 이외에, 비표준 아미노산(예컨대, 4-하이드록시프롤린, 6-N-메틸 라이신, 2-아미노아이소뷰티르산, 아이소발린 및 α -메틸 세린)은 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 잔기에 대해 치환될 수 있다. 제한된 수의 비보존적 아미노산, 유전적 코드에 의해 코딩되지 않은 아미노산 및 비천연 아미노산은 클로스트리듐 폴리펩타이드 아미노산 잔기에 대해 치환될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는 비천연 발생 아미노산 잔기를 또한 포함할 수 있다.
[0646]	비천연 발생 아미노산은, 제한 없이, 트랜스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노-프롤린, cis-4-하이드록시프롤린, 트랜스-4-하이드록시-프롤린, N-메틸글라이신, 알로-트레오닌, 메틸-트레오닌, 하이드록시-에틸시스테인, 하이드록시에틸호모-시스테인, 니트로-글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, tert-류신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐-알라닌, 4-아자페닐-알라닌 및 4-플루오로페닐알라닌을 포함한다. 단백질로 비천연 발생 아미노산 잔기를 흡입하기 위한 몇몇 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 시험관내 시스템을 사용할 수 있고, 여기서 화학적으로 아미노아실화된 억제인자 tRNA를 사용하여 넌센스 돌연변이는 억제된다. 아미노산을 합성하고 tRNA를 아미노아실하기 위한 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 넌센스 돌연변이를 함유하는 플라스미드의 전사 및 번역은 이. 콜라이 S30 추출물을 포함하는 무세포 시스템 및 상업적으로 구입 가능한 효소 및 다른 시약에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예를 들어, 문헌[Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-9, 1993; 및 Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993)]을 참조한다. 제2 방법에서, 번역은 돌연변이된 mRNA 및 화학적으로 아미노아실화된 억제인자 tRNA의 미량주사에 의해 Xenopus 난모세포에서 수행된다(Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). 제3 방법 내에, 이. 콜라이 세포는 대체되는 천연 아미노산(예를 들어, 페닐알라닌)의 부재 하에 및 원하는 비천연 발생 아미노산(들)(예를 들어, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌 또는 4-플루오로페닐알라닌)의 존재 하에 배양된다. 비천연 발생 아미노산은 이의 천연 대응물 대신에 폴리펩타이드로 흡입된다. 문헌[Koide et al., Biochem. 33:7470-6, 1994]을 참조한다. 천연 발생 아미노산 잔기는 시험관내 화학 변형에 의해 비천연 발생 종으로 전환될 수 있다. 화학 변형은 치환의 범위를 추가로 연장시키도록 부위 지시 돌연변이유발과 조합될 수 있다(Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).
[0647]	제한된 수의 비보존적 아미노산, 유전적 코드에 의해 코딩되지 않은 아미노산, 비천연 발생 아미노산 및 비천연

아미노산은 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노산 잔기에 대해 치환될 수 있다.

- [0648] 본 발명의 폴리펩타이드에서의 필수 아미노산은 당해 분야에 공지된 절차, 예컨대 부위 지시 돌연변이유발 또는 알라닌 스캐닝 돌연변이유발에 따라 확인될 수 있다(Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). 생물학적 상호작용의 부위는, 추정상 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 함께 핵 자기 공명, 결정학, 전자 회절 또는 광친화성 라벨링과 같은 기법에 의해 결정된 바와 같은, 구조의 물리적 분석에 의해 또한 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[de Vos et al., *Science* 255:306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992]을 참조한다. 필수 아미노산의 식별은 본 발명의 폴리펩타이드의 관련 성분(예를 들어, 전위 또는 프로테아제 성분)과의 상동성의 분석으로부터 또한 추론될 수 있다.
- [0649] 다수의 아미노산 치환은 돌연변이유발 및 스크리닝의 공지된 방법, 예컨대 문헌[Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) or Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989)]에 의해 개시된 것을 이용하여 만들어지고 시험될 수 있다. 간단히 말하면, 이를 저자들은 각각의 위치에서의 허용 가능한 치환의 스펙트럼을 결정하기 위해 폴리펩타이드에서의 2개 이상의 위치를 동시에 랜덤화하고, 기능성 폴리펩타이드에 대해 선택하고, 이후 돌연변이유발된 폴리펩타이드를 서열분석하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 파지 디스플레이(예를 들어, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner 등의 미국 특허 제 5,223,409호; Huse, WIPO 공보 WO 제92/06204호) 및 영역 지시 돌연변이유발(Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988)을 포함한다.
- [0650] 다수의 아미노산 치환은 돌연변이유발 및 스크리닝의 공지된 방법, 예컨대 문헌[Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53-7, 1988) 또는 Bowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-6, 1989)]에 의해 개시된 것을 이용하여 만들어지고 시험될 수 있다. 간단히 말하면, 이를 저자들은 각각의 위치에서의 허용 가능한 치환의 스펙트럼을 결정하기 위해 폴리펩타이드에서의 2개 이상의 위치를 동시에 랜덤화하고, 기능성 폴리펩타이드에 대해 선택하고, 이후 돌연변이유발된 폴리펩타이드를 서열분석하는 방법을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법은 파지 디스플레이(예를 들어, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-7, 1991; Ladner 등의 미국 특허 제 5,223,409호; Huse, WIPO 공보 WO 제92/06204호) 및 영역 지시 돌연변이유발(Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988)을 포함한다.
- [0651] 임의의 상기 실시형태의 구체적인 구성요소는 다른 실시형태에서의 구성요소에 대해 조합되거나 치환될 수 있다. 더욱이, 본 개시내용의 소정의 실시형태와 연관된 이점이 이 실시형태의 맥락에서 기재되어 있지만, 다른 실시형태는 또한 이러한 이점을 나타낼 수 있고, 모든 실시형태가 본 개시내용의 범위 내에 해당하는 이러한 이점을 반드시 나타낼 필요는 없다.
- [0652] 본 명세서에 기재된 기법의 몇몇 실시형태는 임의의 하기의 숫자 매겨진 문단에 따라 한정될 수 있다:
- [0653] 1. (i) 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx) 및 (ii) 탄저병 독소 보호성 항원(PA), 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 파트 (a) 및 (b)는 함께 연결되거나 융합된, 융합 단백질.
- [0654] 2. 문단 1에 있어서, BTx 또는 TTx는 BTx 또는 TTx 효소 모이어티 및 전위 신호를 포함하는, 융합 단백질.
- [0655] 3. 문단 2에 있어서, BTx 효소 모이어티 또는 전위 신호는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 임의의 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0656] 4. 문단 2에 있어서, BTx 또는 TTx 효소 모이어티 또는 전위 신호는 표 1에서 발견된 각각의 LC 효소 모이어티 또는 HN 전위 웨პ타이드로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0657] 5. 문단 2 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 파트 (a) 및 (b), 또는 효소 모이어티 및 전위 웨პ타이드는 링커 웨პ타이드에 의해 연결된, 융합 단백질.
- [0658] 6. 문단 5에 있어서, 링커 웨პ타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.
- [0659] 7. 문단 5 또는 6에 있어서, 링커 웨პ타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0660] 8. 문단 5 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨პ타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0661] 9. 문단 5 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨პ타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.

- [0662] 10. 문단 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PAd4 도메인, PAd2 및 PAd4 도메인 또는 PA63을 포함하는, 융합 단백질.
- [0663] 11. 문단 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 프로테아제에 의한 절단에 저항성인, 융합 단백질.
- [0664] 12. 문단 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 퓨린 절단 또는 Lys C 절단 또는 둘 다에 저항성인, 융합 단백질.
- [0665] 13. (a) 통각수용체 뉴런에서 SNARE 단백질을 절단할 수 있는 비세포독성 프로테아제; 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편(여기서, PA 또는 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질.
- [0666] 14. 문단 13에 있어서, 비세포독성 프로테아제는 클로스트리듐 신경독소 L 사슬을 포함하는, 융합 단백질.
- [0667] 15. 문단 14에 있어서, 클로스트리듐 신경독소는 보툴리눔 신경독소(BTx) 또는 파상풍 신경독소(TTx)인, 융합 단백질.
- [0668] 16. 문단 14 또는 15에 있어서, 클로스트리듐 신경독소 L 사슬은 표 1로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0669] 17. 문단 13 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 상기 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.
- [0670] 18. 문단 13 내지 16 중 어느 하나에 있어서, PA에 결합할 수 있는 단백질은 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 탄저병 독소 부종 인자(EF)인, 융합 단백질.
- [0671] 19. 문단 18에 있어서, LF의 PA 결합 도메인은 (LFPABD 또는 LFn이라 축약된) LF의 N 말단 도메인인, 융합 단백질.
- [0672] 20. 문단 18에 있어서, EF의 PA 결합 도메인은 (EFPABD 또는 EFn이라 축약된) EF의 N 말단 도메인인, 융합 단백질.
- [0673] 21. (a) 통각수용체 뉴런에서 이온 채널을 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 웨타이드 독소(이것은 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소를 포함함); 및 (b) 통각수용체 뉴런에서의 결합 부위에 결합할 수 있는 표적화 모이어티(TM)(여기서, 통각수용체 뉴런은 내부에 상기 이온 채널(예를 들어, 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 둘 다)을 발현함)를 포함하는, 융합 단백질.
- [0674] 22. 문단 21에 있어서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함하는, 융합 단백질.
- [0675] 23. 문단 21 또는 22에 있어서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬토톡신 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.
- [0676] 24. 문단 21, 22 또는 23에 있어서, TM은 탄저병 독소 보호성 항원(PA); PA의 C 말단 수용체 결합 도메인; 및 통각수용체 뉴런 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0677] 25. 문단 24에 있어서, PA 또는 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 통각수용체 뉴런에서 발현된 ANTXR2(CMG2) 수용체와 상호작용하고 이에 결합하는, 융합 단백질.
- [0678] 26. 문단 24 또는 25에 있어서, PA는 퓨린 절단에 저항성인 돌연변이체 또는 변이체 PA인, 융합 단백질.
- [0679] 27. 문단 24, 25 또는 26에 있어서, PA의 C 말단 수용체 결합 도메인은 PA63 또는 PAd4이거나, PAd2 및 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.
- [0680] 28. 문단 27에 있어서, PAd4는 프로테아제에 의한 절단에 저항성인, 융합 단백질.
- [0681] 29. 문단 28에 있어서, 프로테아제는 퓨린 또는 Lys C인, 융합 단백질.
- [0682] 30. 문단 24 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체인, 융합 단백질.
- [0683] 31. 문단 30에 있어서, 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 신경 성장 인자 수용체, ANTXR2 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합하는, 융합 단백질.
- [0684] 32. 문단 31에 있어서, 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된, 융합 단백질.

- [0685] 33. (a) 통각수용체 뉴런에서 나트륨 또는 칼슘 또는 나트륨 및 칼슘 채널 둘 다를 차단할 수 있는 다이설파이드 함유 펩타이드 독소(이것은 시스테인-노트 모티프를 가지는 채널 차단 독소임); 및 (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질(여기서, 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함)을 포함하는, 융합 단백질.
- [0686] 34. 문단 33에 있어서, 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 시스테인 노트 모티프를 포함하는, 융합 단백질.
- [0687] 35. 문단 33 또는 34에 있어서, 다이설파이드 함유 펩타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 엘타-팔루톡신, 후웬 토톡신 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.
- [0688] 36. 문단 33, 34 또는 35에 있어서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.
- [0689] 37. 문단 33 내지 37 중 어느 하나에 있어서, PA에 결합할 수 있는 단백질은 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 탄저병 독소 부종 인자(EF)인, 융합 단백질.
- [0690] 38. (a) AB 독소; (b) 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 또는 이의 단편(여기서, PA 또는 단편은 통각수용체 뉴런에서 발현된 수용체에 결합함); 및 (c) 엔도솜 내로부터 엔도솜 막에 걸쳐 통각수용체 뉴런의 시토솔로 프로테아제를 전위시킬 수 있는 전위 도메인(translocation domain: TL)을 포함하는, 융합 단백질.
- [0691] 39. 문단 38에 있어서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쉬가 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0692] 40. 문단 38 또는 39에 있어서, 통각수용체 뉴런에서 발현된 PA 결합 수용체는 ANTXR2(CMG2)인, 융합 단백질.
- [0693] 41. 문단 38, 39 또는 40에 있어서, PA 단편은 PA의 C 말단 수용체 결합 도메인인, 융합 단백질.
- [0694] 42. 문단 38 내지 41 중 어느 하나에 있어서, TL은 클로스트리듐 신경독소 전위 도메인; 홀로톡신; 또는 무효화된 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 가지는 홀로톡신의 변이체인, 융합 단백질.
- [0695] 43. 임의의 이전의 문단에 따른 융합 단백질을 코딩하는 핵산.
- [0696] 44. 문단 43의 핵산을 포함하는 벡터.
- [0697] 45. 문단 44에 있어서, 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자인, 벡터.
- [0698] 46. 문단 43의 핵산 또는 문단 44 또는 45의 벡터를 포함하는 세포.
- [0699] 47. 임의의 이전의 항의 융합 단백질을 제조하는 방법으로서, 융합 단백질이 발현되는 조건에서 문단 46의 세포를 배양하는 단계; 및 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0700] 48. 문단 47의 방법에 의해 제조된 융합 단백질.
- [0701] 49. 이전의 문단 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0702] 50. 통증을 치료하는 방법으로서, 임의의 이전의 조성물을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0703] 51. 통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0704] 52. 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 연결된, BTx의 N 말단 효소 도메인(L 사슬) 및 중간 기공 형성/전위 도메인(H_N)을 포함하는 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티를 포함하는, 융합 단백질.
- [0705] 53. 문단 52에 있어서, BTx 모이어티와 PAd4 도메인 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0706] 54. 문단 53에 있어서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.
- [0707] 55. 문단 53 또는 54에 있어서, 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.

- [0708] 56. 문단 53 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0709] 57. 문단 53 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 링커 펩타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0710] 58. 문단 52 내지 57 중 어느 하나에 있어서, BTx 모이어티는 BTx/A, BTx/B, BTx/C, BTx/D, BTx/E, BTx/F, BTx/G, 및 제1 비클로스트리듐 보툴리눔 유사 독소 중 임의의 하나의 BTx 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0711] 59. 문단 52 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질은 텐덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.
- [0712] 60. 문단 52 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 BTx 모이어티와 PAd4 사이에 추가로 혼입된, 융합 단백질.
- [0713] 61. 문단 52 내지 60 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번 및 729번, 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0714] 62. 문단 52 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0715] 63. 문단 52 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 철단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 펩타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.
- [0716] 64. 문단 63에 있어서, 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR(서열 번호 32) 또는 SSSS(서열 번호 33)인, 융합 단백질.
- [0717] 65. 문단 52 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 1에서의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상(넘버링은 서열 번호 1로부터의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀 후의 것임)은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0718] 66. 문단 52 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0719] 67. 문단 52 내지 66 중 어느 하나에 있어서, BTx의 L 사슬과 BTx의 H_N 사슬 사이의 연접부에 상응하는 잔기는 철단된, 융합 단백질.
- [0720] 68. 문단 52 내지 67 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0721] 69. 문단 68에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0722] 70. 보툴리눔 신경독소(BTx) 모이어티의 보툴리눔 신경독소 N 말단 효소 도메인(BTx의 L 사슬), 및 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(ELFn)에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 효소 도메인에 결합함)을 포함하는(여기서, 파트 (a)는 파트 (b)에 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 연결됨), 융합 단백질.
- [0723] 71. 문단 70에 있어서, BTx 모이어티의 C 말단 측에 위치한, BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트를 한정하는 아미노산 서열을 추가로 포함하고, 벨트는 L 사슬에 연결된, 융합 단백질.
- [0724] 72. 문단 71에 있어서, BTx H_N 도메인의 벨트와의 L 사슬 연접부에 상응하는 잔기는 철단된, 융합 단백질.
- [0725] 73. 문단 71 또는 72에 있어서, BTx L 사슬에서의 Cys 잔기 및 BTx H_N 도메인의 N 말단 파트에 상응하는 벨트는 Ala, Ser 또는 Thr로 변경된, 융합 단백질.
- [0726] 74. 문단 70 내지 73 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.

- [0727] 75. 문단 70 내지 73 중 어느 하나에 있어서, BTx L 모이어티와 LFn 또는 EFn 도메인 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0728] 76. 문단 75에 있어서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.
- [0729] 77. 문단 75 또는 76에 있어서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0730] 78. 문단 75 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0731] 79. 문단 75 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 Lys 또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0732] 80. 문단 70 내지 79의 융합 단백질 중 어느 하나를 포함하는 조성물.
- [0733] 81. 문단 80에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0734] 82. 문단 80 또는 81의 조성물 및 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 단백질.
- [0735] 83. 문단 82에 있어서, PA 단백질은 올리고머 PA인, 조성물.
- [0736] 84. 문단 83에 있어서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된, 조성물.
- [0737] 85. 문단 80 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는. 조성물.
- [0738] 86. 다이설파이드 함유 웨타이드 독소에 연결된, 탄저병 독소 보호성 항원(PA); 탄저병 독소 보호성 항원 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4); 또는 통각수용체 뉴런 결합 단백질을 포함하는, 융합 단백질.
- [0739] 87. 문단 86에 있어서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 저해제 시스테인 노트 독소인, 융합 단백질.
- [0740] 88. 문단 86 또는 87에 있어서, 다이설파이드 함유 웨타이드 독소는 코노톡신, 아가톡신, 텔타-팔루톡신, 후웬 토톡신 또는 ProTx II 독소인, 융합 단백질.
- [0741] 89. 문단 86, 87 또는 88에 있어서, PA, PAd4 또는 통각수용체 결합 단백질과 저해제 시스테인 노트 독소 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0742] 90. 문단 89에 있어서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0743] 91. 문단 89 또는 90에 있어서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0744] 92. 문단 89 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0745] 93. 문단 89 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질은 텐덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.
- [0746] 94. 문단 89 내지 93 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 703번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 또는 PA에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0747] 95. 문단 94에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0748] 96. 문단 89 내지 95 중 어느 하나에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 ¹⁶⁴RKKR¹⁶⁷을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 웨타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.
- [0749] 97. 문단 96에 있어서, 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.
- [0750] 98. 문단 89 내지 97 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 또는 PA에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

- [0751] 99. 문단 89 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0752] 100. 문단 89 내지 99 중 어느 하나에 있어서, 통각수용체 뉴런 결합 단백질은 항체인, 융합 단백질.
- [0753] 101. 문단 100에 있어서, 항체는 통각수용체 뉴런에 존재하는 신경 성장 인자 수용체 또는 이온 채널 단백질에 특이적으로 결합하는, 융합 단백질.
- [0754] 102. 문단 101에 있어서, 이온 채널 단백질은 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0755] 103. 문단 86 내지 102 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0756] 104. 문단 103에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0757] 105. 탄저병 독소 치사 인자의 N 말단 도메인(LFn)에 대한 하나 이상의 부위에서 N 말단으로 또는 C 말단으로 또는 N 말단 및 C 말단 둘 다로 작동 가능하게 연결된, 또는 화학적으로 가교결합된(여기서, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태; 또는 탄저병 독소 부종 인자의 N 말단 도메인(EFn)에 결합하고, 도메인은 PA63의 올리고머 형태, 탄저병 PA의 단백질분해로 활성화된 형태에 결합함), 다이설파이드 함유 웨타이드 독소를 포함하는 융합 단백질.
- [0758] 106. 문단 105에 있어서, LFn과 독소 또는 EFn과 독소 사이에 링커 웨타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0759] 107. 문단 106에 있어서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0760] 108. 문단 106 또는 107에 있어서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0761] 109. 문단 106, 107 또는 108에 있어서, 링커 웨타이드는 Lys 및/또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0762] 110. 문단 105 내지 109 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0763] 111. 문단 110에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0764] 112. 문단 110 또는 111에 있어서, 네이티브 탄저병 독소 보호성 항원(PA)을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0765] 113. 문단 112에 있어서, PA는 올리고머 PA로 있는, 조성물.
- [0766] 114. 문단 113에 있어서, 올리고머 PA는 융합 단백질에 결합된, 조성물.
- [0767] 115. 문단 110 내지 114 중 어느 하나에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는. 조성물.
- [0768] 116. 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 작동 가능하게 연결된 링커 웨타이드에 융합된 AB 독소를 포함하는 융합 단백질로서, 융합 단백질은 무효화된 AB 독소의 독소 수용체 결합 기능을 가지는 전위 도메인, 홀로톡신 또는 홀로톡신의 돌연변이체 형태를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0769] 117. 문단 116에 있어서, AB 독소는 리신 독소, 콜레라 독소 A 파트 및 B 파트; 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A A 파트 및 B 파트; 쉬가 독소 A 파트 및 B 파트; 및 디프테리아 독소 A 파트 및 B 파트로부터 선택된, 융합 단백질.
- [0770] 118. 문단 116 또는 117에 있어서, 링커 웨타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.
- [0771] 119. 문단 116 내지 118 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0772] 120. 문단 116 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0773] 121. 문단 116 내지 120 중 어느 하나에 있어서, 링커 웨타이드는 Lys 및 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0774] 122. 문단 116 내지 121 중 어느 하나에 있어서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 AB 독소와 PAd4 사이에 추가로 혼입된, 융합 단백질.
- [0775] 123. 문단 116 내지 122 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 웨타이드를 뺀) 서열 번호 1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단

백질.

- [0776] 124. 문단 116 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0777] 125. 문단 116 내지 124 중 어느 하나에 있어서, 탠덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.
- [0778] 126. 문단 116 내지 125 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 701번, 713번, 719번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인(PAd4)에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0779] 127. 문단 116 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0780] 128. 문단 116 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 펩타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.
- [0781] 129. 문단 128에 있어서, 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.
- [0782] 130. 문단 114 내지 129 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0783] 131. 문단 130에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0784] 132. 탄저병 독소 보호성 항원의 C 말단 수용체 결합 도메인(PAd4 도메인)에 작동 가능하게 연결된 파상풍 신경 독소(TTx)로부터의 전위/기공 형성 도메인과 함께 N 말단 효소 도메인(사슬 A)을 포함하는, 융합 단백질.
- [0785] 133. 문단 132에 있어서, TTx 모이어티와 PAd4 도메인 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0786] 134. 문단 133에 있어서, 링커 펩타이드는 1개 내지 20개의 아미노산 길이인, 융합 단백질.
- [0787] 135. 문단 133 또는 134에 있어서, 링커 펩타이드는 적어도 1분 동안 인간 혈청에서 안정한, 융합 단백질.
- [0788] 136. 문단 133, 134, 또는 135에 있어서, 링커 펩타이드는 Gly 또는 Ser인 적어도 하나의 아미노 아미노산을 포함하는, 융합 단백질.
- [0789] 137. 문단 133 내지 136 중 어느 하나에 있어서, 링커 펩타이드는 Lys 또는 Arg를 포함하지 않는, 융합 단백질.
- [0790] 138. 문단 132 내지 137 중 어느 하나에 있어서, 탠덤으로 2개 내지 10개의 PAd4 도메인을 포함하는, 융합 단백질.
- [0791] 139. 문단 132 내지 138 중 어느 하나에 있어서, 네이티브 PAd4 도메인에 인접한 N 말단 측으로부터 1개 내지 60개의 연속적 아미노산은 BTx 모이어티와 PAd4 사이에 추가로 혼입된, 융합 단백질.
- [0792] 140. 문단 132 내지 139 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호 1의 594번, 613번, 633번, 637번, 653번, 673번, 679번, 680번, 684번, 695번, 701번, 713번, 719번, 722번, 723번, 729번 및 730번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0793] 141. 문단 132 내지 140 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 1에서의 623번, 642번, 662번, 666번, 682번, 702번, 708번, 709번, 713번, 724번, 732번, 751번, 752번, 758번 및 759번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Lys 잔기 중 하나 이상, 이들까지 및 이들 포함은 Arg 또는 His에 의해 대체된, 융합 단백질.
- [0794] 142. 문단 132 내지 141 중 어느 하나에 있어서, 전체 PA 단백질을 포함하고, 아미노산 잔기 RKKR을 포함하는 퓨린 절단 부위는 퓨린 저항성 아미노산 서열에 의해 대체되고, RKKR은 서열 번호 1에서의 29개의 아미노산 신호 펩타이드를 뺀 서열 번호 1의 164-167번 잔기인, 융합 단백질.
- [0795] 143. 문단 142에 있어서, 퓨린 저항성 아미노산 서열은 SSSR 또는 SSSS인, 융합 단백질.
- [0796] 144. 문단 132 내지 143 중 어느 하나에 있어서, (서열 번호 1에서의 29개의 aa 신호 펩타이드를 뺀) 서열 번호

1의 601번, 713번, 719번 위치에서의 PAd4 도메인에서의 Asn 잔기 중 하나 이상은 Asp에 의해 대체된, 융합 단백질.

- [0797] 145. 문단 132 내지 144 중 어느 하나에 있어서, 융합 단백질의 N 말단에서 적어도 하나의 D-아미노산을 추가로 포함하는, 융합 단백질.
- [0798] 146. 문단 132 내지 145 중 어느 하나에 있어서, TTx의 중쇄와의 TTx의 경쇄 연접부에 상응하는 잔기는 절단된, 융합 단백질.
- [0799] 147. 문단 132 내지 146 중 어느 하나의 융합 단백질을 포함하는 조성물.
- [0800] 148. 문단 147에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0801] 149. 임의의 문단 52-67, 70-79, 86-102, 105-109, 116-129 및 132-146의 임의의 융합 단백질을 코딩하는 핵산.
- [0802] 150. 문단 149의 핵산을 포함하는 백터.
- [0803] 151. 문단 150에 있어서, 상기 백터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 바이러스 백터인, 백터.
- [0804] 152. 문단 149의 핵산 또는 문단 150 또는 151의 백터를 포함하는 세포.
- [0805] 153. 임의의 이전의 문단의 융합 단백질을 제조하는 방법으로서, (i) 융합 단백질이 발현되는 조건에서 문단 152의 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0806] 154. 문단 153의 방법에 의해 제조된 융합 단백질.
- [0807] 155. 임의의 문단 1-42, 52-67, 70-79, 86-102, 105-109, 116-129 및 132-146에 있어서, 글라이코실화된, 융합 단백질.
- [0808] 156. 임의의 문단 1-42, 52-67, 70-79, 86-102, 105-109, 116-129 및 132-146에 있어서, 비글리이코실화된, 융합 단백질.
- [0809] 157. 문단 153에 있어서, 세포는 박테리아 세포인, 방법.
- [0810] 158. 문단 157에 있어서, 박테리아 세포는 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*)인, 방법.
- [0811] 159. 문단 153에 있어서, 세포는 효모 세포인, 방법.
- [0812] 160. 문단 159에 있어서, 효모는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 방법.
- [0813] 161. 문단 159에 있어서, 효모는 세포 글라이코실화 결핍된, 방법.
- [0814] 162. 문단 159에 있어서, 효모는 글라이코실화 및 프로테아제 결핍된, 방법.
- [0815] 163. 문단 153에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포인, 방법.
- [0816] 164. 문단 163에 있어서, 상기 포유류 세포는 COS 세포, CHO 세포 또는 NS0 세포인, 방법.
- [0817] 165. 통증의 치료를 위한, 이전의 문단의 임의의 융합 단백질의 용도.
- [0818] 166. 통증의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 이전의 문단의 임의의 융합 단백질의 용도.
- [0819] 167. 통증을 치료하는 방법으로서, 문단 49, 68-69, 80-85, 103-104, 110-115, 130-131 및 147-148로부터 선택된 조성물을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0820] 168. 문단 167에 있어서, 투여는 척추강내 점적주사 또는 뇌실내 점적주사에 의해 또는 중추 신경계로의 경막외 주사에 의해, 또는 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 신경내 주사 또는 관절내 주사를 사용한 말초 투여에 의해 수행되는, 방법.
- [0821] 169. 문단 168에 있어서, 통증은 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 및 다른 전신 통증 장애로부터 선택된, 방법.
- [0822] 170. 신경, 관절, 피부, 내장, 방광 또는 근육 통증을 치료하는 방법으로서, 문단 49, 68-69, 80-85, 103-104, 110-115, 130-131 및 147-148로부터 선택된 조성물을 이를 요하는 대상체에게 피내 주사, 피하 주사, 근육내 주사

사, 신경내 주사 또는 관절내 주사에 의해 말초로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0823] 171. 당뇨병성 신경병성 통증, 암 통증, 섬유근육통 또는 다른 전신 통증 장애를 치료하는 방법으로서, 문단 49, 68-69, 80-85, 103-104, 110-115, 130-131 및 147-148로부터 선택된 조성물을 이를 요하는 대상체의 중추 신경계로 경막외 주사, 척추강내 점액주사 또는 뇌실내 점액주사에 의해 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0824] 172. 문단 167 내지 171 중 어느 하나에 있어서, 제80항 내지 제85항 및 제110항 내지 제115항 중 어느 한 항의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제 내에 탄저병 보호성 항원(PA)을 포함하는 조성물을 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 투여한 후에 별개로 투여되는, 방법.

[0825] 173. 통증을 치료하는 방법으로서, 네이티브 성숙 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 및 탄저병 독소 부종 인자(EF), 탄저병 독소 치사 인자(LF) 또는 임의의 이들의 조합을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0826] 174. 통증의 치료를 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 약제학적 조성물은 이전의 문단에 기재된 하나 이상의 융합 단백질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 방법.

[0827] 175. 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX))와 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는, 조작된 융합 단백질.

[0828] 176. 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX)) 및 보호성 항원(PA) 모이어티와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질.

[0829] 177. 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질.

[0830] 178. 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는, 조작된 융합 단백질.

[0831] 179. 문단 177 또는 178에 있어서, 분자는 신경 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체로부터 선택된, 조작된 융합 단백질.

[0832] 180. 임의의 이전의 문단에 있어서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 치사 독소(치사 인자), 및/또는 부종 독소(부종 인자)로부터 선택된, 조작된 융합 단백질.

[0833] 181. 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 (예를 들어, 화학적으로) 변형된 또는 돌연변이체 PA(mPA)(여기서, mPA 네이티브 수용체 결합 기능은 차단됨), 및 특이적으로 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 치사 인자(LF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는 조작된 융합 단백질.

[0834] 182. 임의의 이전의 문단에 있어서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태인, 조작된 융합 단백질.

[0835] 183. 문단 182에 있어서, 올리고머 형태는 분자에 결합된, 조작된 융합 단백질.

[0836] 184. 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX))과 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(Pad4)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물.

[0837] 185. 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTX))와 융합된 탄저병 독소 치사 인자 도메인(LFn) 및 보호성 항원(PA) 모이어티를 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물.

[0838] 186. 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA) 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물로서, mPA는 PA 네이티브 수용체 결합 기능이 차단되도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된, 조성물.

[0839] 187. 문단 186에 있어서, 분자는 신경 성장 인자, 및 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체로부터 선택되는, 조성물.

- [0840] 188. 문단 186 또는 187에 있어서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 치사 독소(치사 인자), 및/또는 부종 독소(부종 인자)로부터 선택되는, 조성물.
- [0841] 189. 특이적으로 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA), 및 탄저병 독소 부종 인자(EF)와 조합되어 통각수용체 뉴런 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물로서, mPA는 PA 네이티브 수용체 결합 기능이 차단되도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형되거나 돌연변이된, 조성물.
- [0842] 190. 임의의 이전의 문단에 있어서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태인, 조성물.
- [0843] 191. 문단 190에 있어서, 올리고머 형태는 분자에 결합된, 조성물.
- [0844] 192. 임의의 이전의 문단에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0845] 193. 통증을 치료하는 방법으로서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(PAd4)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계(여기서, 조작된 융합 단백질은 통각수용체 뉴런으로 전달되고, 통각수용체 뉴런에서의 감소한 세포내 신호전달 사건 또는 통각수용체 뉴런으로부터의 감소한 신경전달물질 방출을 발생시킴)를 포함하는, 방법.
- [0846] 194. 문단 193에 있어서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 치사 독소(치사 인자), 및/또는 부종 독소(부종 인자)로부터 선택되는, 방법.
- [0847] 195. 통증을 치료하는 방법으로서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx))와 융합된 탄저병 독소 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 이의 수용체 결합 도메인(PAd4)을 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0848] 196. 통증을 치료하는 방법으로서, 저해제 시스테인 노트(ICK) 독소(예를 들어, 코노톡신(CTx)) 및 보호성 항원(PA) 모이어티와 융합된 탄저병 독소 치사 인자(LFn)를 포함하는 조작된 융합 단백질을 포함하는 조성물의 유효 량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0849] 197. 임의의 이전의 문단에 있어서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0850] 198. 통증을 치료하는 방법으로서, 통각수용체 표면 수용체 또는 이온 채널 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 분자와 융합된 이의 네이티브 수용체 결합 기능을 차단하도록 변경된 탄저병 보호성 항원(PA) 모이어티 또는 돌연변이체 탄저병 보호성 항원(mPA) 모이어티, 및 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인에 융합된 탄저병 치사 인자 도메인(LFn)을 포함하는 조작된 융합 단백질의 유효 통증 감소량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0851] 199. 문단 198에 있어서, 분자는 신경 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 및 Nav1.7, Nav1.8 또는 Nav1.9에 특이적으로 결합하는 항체로부터 선택되는, 방법.
- [0852] 200. 문단 198 또는 199에 있어서, 세포내로 작용하는 독소 촉매 도메인은 디프테리아 독소(DTx), 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx), 보툴리눔 독소(BTx) 파상풍 독소(TTx), 쉬가 독소, 리신 독소, 치사 독소(치사 인자), 및/또는 부종 독소(부종 인자)로부터 선택된, 방법.
- [0853] 201. 특이적으로 네이티브 보호성 항원(PA) 또는 돌연변이체 PA(mPA), 및 탄저병 독소 부종 인자(EF) 및/또는 치사 인자(LF)와 조합되어 통각수용체 표면 분자를 표적화할 수 있는 분자를 포함하는 조작된 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 이를 요하는 대상체에서 통증을 치료하는 방법으로서, mPA는 PA 네이티브 수용체 결합 기능이 차단되도록 (예를 들어, 화학적으로) 변형된 또는 돌연변이된, 방법.
- [0854] 202. 임의의 이전의 문단에 있어서, PA 또는 mPA는 올리고머 형태로 투여되고, 올리고머 PA 또는 mPA는 수용체 보유 세포에 대한 증가한 결합활성을 달성하도록 단백질분해로 활성화된 PA 또는 mPA(또는 이의 돌연변이체)로부터 형성된, 방법.

- [0855] 203. 문단 202에 있어서, 올리고머 형태는 투여하기 전에 문자에 결합된, 방법.
- [0856] 204. 문단 202 또는 203에 있어서, 올리고머 형태는 "이펙터 문자"를 투여하기 전에, 투여하는 것과 동시에 또는 투여한 후에 별개의 주사로 투여되는, 방법.
- [0857] 본 명세서에 기재된 기법은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되고, 이것은 어떤 방식으로든 추가로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0858] **실시예**
- [0859] **실시예 1**
- [0860] 본 발명자들은 ANTXR2인 주요 탄저병 독소 수용체가, 다른 뉴런 아형 및 CNS 조직과 비교하여, 통각수용체 뉴런에 의해 고도로 및 특이적으로 발현된다는 것을 발견하였다. 탄저병 독소에 고유한 엔도솜 전달 기전을 이용함으로써, 본 발명자들은 통각수용체로 문자 카고를 특이적으로 전달할 수 있고, 이것은 다른 신경학적 부작용을 야기하지 않으면서 통증 특이적 블록을 발생시킬 것이다.
- [0861] 이 발견에 기초하여, 본 발명자들은 (1) 만성 통증 병태에서 통증 특이적 봉쇄 및 표적화된 진통 기전을 제공한다. 이 병태는 골관절염, 경직, 류마티스성 관절염, 화학치료 유도된 신경통 및 암 통증을 포함한다. (2) 근육 경직의 치료. 통증은 경련성 질환 병태의 주요 성분이다. 통각수용체에 의해 촉발된 운동감각 반사 회로의 이상 조절은 근육 경직을 몰아갈 수 있다. 본 발명자들은 탄저병 독소 매개된 통각수용체 침묵화가 통증을 치료할 뿐만 아니라 근육 경직을 감소시킬 수 있다고 가정한다. (3) 골관절염성 병태의 치료. 관절 통증 및 파괴는 골관절 질환 및 류마티스성 질환의 주요 성분이다. 신경계(여기서 이것은 통각수용체에 특이적임) 밖에서, 본 발명자들은 관절을 ANTXR2가 매개하는 중요한 조혈 세포인 마크로파지, 조골세포 및 파골세포에 의해 고도로 발현된다는 것을 발견하였다. 신경학적 부작용 없이 통각수용체를 통해 관절 통증을 특이적으로 표적화하고, 관절 파괴를 매개하는 마크로파지, 조골세포 및 파골세포를 동시에 표적화하도록, 탄저병 독소 및 이의 전달 기전을 이용할 수 있다.
- [0862] 이의 빌트인 엔도솜 도파 및 시토졸 전달 기전을 통해 통각수용체 뉴런으로 선택된 문자 카고 단백질을 특이적으로 표적화하도록 탄저병 독소를 사용할 수 있는지를 결정하기 위해. 본 발명자들은 몇몇 질환 병태(골관절염, 근육 손상, 류마티스성 관절염, 화학치료 유도된 신경통, 암 통증)에서의 만성 통증, 및 골관절염에서의 관절 파괴를 침묵화시키도록 탄저병 독소를 사용할 수 있는지를 추가로 시험할 것이다.
- [0863] 본 발명자들은 ANTXR2가 통각수용체 뉴런에서 고도로 발현되고, 본 발명자들의 자세한 FACS 정제된 체성감각 뉴런 발현 데이터베이스, 인시츄 혼성화 데이터베이스 및 조직 발현 데이터베이스에 기초하여, 다른 뉴런 아형과 비교하여 이 뉴런에 특이적이라는 것을 최근에 발견하였다. ANTXR2는 관절 파괴에서 중요한 세포형인 마크로파지, 조골세포 및 파골세포에서 또한 고도로 발현된다. 이 발현은 골관절염에서의 관절 파괴를 느리게 하도록 탄저병 독소가 이를 세포로 카고를 전달하게 잠재적으로 허용한다.
- [0864] 본 발명자들은 상이한 질환 병태에서 만성 통증 또는 관절 파괴를 특이적으로 차단하도록 탄저병 독소 또는 이의 전달 기전을 이용한다. 몇몇 분야에서, 본 발명자들은 치사 인자(MAP 키나제를 침묵화시키는 LF) 또는 부종 인자(EF, 칼슘 독립적 아데닐레이트 시클라아제)와 함께 보호성 항원(PA), 수용체 결합 성분으로 이루어진 네이티브 탄저병 독소를 사용할 것이다. 다른 분야에서, 본 발명자들은 디프테리아 독소(DTA) 또는 리신(Rcn)을 포함하는 다른 박테리아 독소의 효소 모이어티의 세포질 전달을 매개하기 위한 플랫폼으로서 탄저병 독소를 사용할 것이다.
- [0865] 통증을 침묵화하기 위한 네이티브 탄저병 독소(PA, LF, EF). 탄저병 피부 감염은 무통증인 병변을 야기한다. ANTXR2에 결합하는 PA는 치사 인자(LF)(이것은 MAP 키나제를 차단하는 것으로 공지됨) 또는 부종 인자(EF)(이것은 아데닐레이트 시클라아제임)의 전달을 매개한다. MAP 키나제 및 cAMP 경로 둘 다는 통각수용체 감작화 및 만성 통증을 매개하고, 이의 조절은 통증을 침묵화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 상이한 질환 병태에서 통증 봉쇄를 유도하기 위해 PA+LF, PA+EF 또는 PA+LF+EF의 조합의 국소 피하 또는 관절 주사를 이용할 것이다.
- [0866] 통증 및 관절염성 관절 파괴를 침묵화시키기 위한 디프테리아 독소(DTA) 또는 리신(Rcn)의 효소 모이어티의 탄저병 독소 매개된 시토졸 전달: 탄저병 독소의 수용체 결합 및 기공 형성 아단위인 PA는 통각수용체 뉴런, 마크로파지 및 파골세포를 포함하는 관절에서의 ANTXR2+ 세포로 디프테리아 독소(DTA) 또는 리신(Rcn)의 효소 도메인에 융합된 치사 인자(LFn)의 PA 결합 도메인을 특이적으로 전달하도록 사용될 것이다. 이를 독소는 통증 및 관절 파괴를 침묵화시키도록 골관절염성 또는 류마티스성 관절염성 관절로 주사될 것이다.

- [0867] 마우스 모델에서, 본 발명자들은 골관절염(예를 들어, 모노요오도아세테이트 주사를 통해), 근육 손상(예를 들어, 심장독소 유도된 손상), 류마티스성 관절염(예를 들어, K/BxN 혈청 이동 관절염), 화학치료 유도된 신경통(예를 들어, 파클리탁셀), 및 암 통증(예를 들어, 에를리히 세포 모델)의 동물 모델에서 통증 봉쇄 또는 관절 보존의 효능을 시험하기 위해 상기 탄저병 독소 분자 또는 분자 조합을 국소로 피하로 또는 관절로 전달할 것이다.
- [0868] 통증 거동 시험은 기계적 및/또는 열적 통각과민에 대한 효과를 평가할 것이다. 본 발명자들은 뉴런 및 뉴런 활성 블록으로의 세포내 독소의 전달을 검출하도록 1차 통각수용체 뉴런에서 전기생리학을 또한 수행할 것이다. 관절 병리학은 염증 및 조직학적 분석의 측정치에 의해 분석될 것이다.
- [0869] 중요하게는, 본 발명자들은 보툴리눔 독소(BTx)의 효소 모이어티를 전달하기 위한 탄저병 독소 플랫폼을 또한 이용할 수 있다.
- [0870] 도 1a 및 도 1b는 11개의 다른 신경 조직 유형과 비교하여 배근 신경절 내에 주요 탄저병 독소 수용체에 대한 수용체의 특이적인 높은 수준 발현을 도시한다.
- [0871] 도 2는 또 다른 체성감각 뉴런 아형, 자기수용기(Parv-Cre/TdTomato+)에 대해 정제된 마우스 통증 감지 통각수용체 뉴런(Nav1.8-Cre/TdTomato+) 사이의 전체 전사체 데이터를 비교한다. 이들이 관련된 세포형이지만, 통증 감지 Nav1.8+ 통각수용체 뉴런은 자기수용기와 비교하여 Antxr2의 매우 농후한 발현을 보여준다. Antxr2는 자기수용기 뉴런에 대해 통각수용체에서 5배 초과 농후하다($P < 10^{-5}$).
- [0872] 종합하면, 도 1 및 도 2로부터의 이 데이터는 탄저병 독소에 대한 수용체인 Antxr2가 다른 CNS 조직 및 자기수용기 뉴런과 비교하여 통각수용체 뉴런에서 매우 농후하다는 것을 보여준다. 이것은 Antxr2가 다른 뉴런 아형에 대해 통증 감지 뉴런을 특이적으로 표적화하도록 사용될 수 있다는 것을 강하게 나타낸다.
- [0873] **실시예 2 - 시험관내 효능의 평가(1)**
- [0874] 본 발명자들은 탄저병 독소 성분이 배양물 중에 통각수용체로 전달될 수 있는지를 결정하도록 실험하였다. 이것은 조합 PA 및 조작된 융합 단백질 LFn-DTA의 존재 하의 포유류 세포에서의 단백질 합성의 저해에 대해 시험하고, PA 및 EF의 조합의 존재 하의 포유류 세포에서의 세포내 cAMP 수준의 증가에 대해 시험하고, 조합 PA 및 LF의 존재 하의 포유류 세포에서의 MAPK 신호전달의 저해에 대해 시험할 것이다.
- [0875] 뉴런으로 독소를 전달하기 위해 탄저병 전달 시스템이 사용될 수 있다는 개념 증명을 위해 세포내 효소 독소로서 디프테리아 독소(DTA)의 사슬을 사용한다. DTA는 EF-2의 ADP-리보실화를 촉매화하고 단백질 합성을 저해한다. LFn-DTA인 융합 단백질은 세포질로의 PA 매개된 전위를 평가하도록 흔히 사용된다. 문헌[Milne et al. Mol. Microbiol. Feb;15(4):661-6, (1995) 및 in Liao et al. Chem. Bio. Chem., 15(16): 2458-2466, (2014)]에 이전에 기재된 바대로, LFn-DTA 또는 DTA-LFn인 융합 단백질과 함께 20nM PA에 의해 처리된 CHO-K1 세포는 융합 단백질의 펩토몰 또는 피코몰 농도에서 단백질 합성을 완전히 중단시켰다.
- [0876] 본 발명자의 실험을 위해, DRG 뉴런을 야생형 B6 마우스로부터 수확하고, 약 2000개의 뉴런/웰의 세포 밀도로 밤새 배양하였다. 세포를 3H-leu(400nM)의 존재 하에 37°C에서 6시간 동안 다양한 농도의 PA 및 LFn-DTA에 의해 처리하였다. 단백질 합성을 방사선 표지된 류신(3H-leu)을 사용하여 측정하고, 새로 합성된 단백질은 3H-leu를 새로운 단백질로 혼입할 것이다. 항온처리 기간 후, 뉴런을 F12K 배지(1eu 비함유)에 의해 세척하고, 이후 F12K 배지(1eu 비함유) 중에 3H-leu와 항온처리한 후, PBS에 의해 세척하고, 이후 마지막으로 새로 합성된 단백질 중의 혼입된 3H-leu 방사능의 측정을 위해 섬광 유체 중에 용해시켰다. LFn-DTA를 첨가하지 않고 PA에 의해 대조군 실험을 수행하였다. 실험 방사능으로부터 배경 3H-leu 방사능을 공제하고, 공제된 데이터를 비처리된 뉴런의 것에 정규화하였다. PA 단독에 의해 뉴런을 처리할 때 단백질 합성의 유의미한 저해가 관찰되지 않았다(도 3 및 도 4). 따라서, PA 단독은 뉴런에서 단백질 합성에 영향을 미치지 않는다. 그러나, PA 및 LFn-DTA는 배양된 뉴런에서 나노몰 농도에서 단백질 합성을 강력하게 저해한다. (도 5 및 6).

[0877]

서열 목록

서열 번호 1, PA, NCBI 기준 서열: NP_052806

1 MKKRKVLIPPL MALSTILVSS TGNLEVIQAE VKQENRLLNE SESSSQGLLG YYFSDLNFQA
 61 PMVVTSSSTTG DLSIPSSELE NIPSENQYFQ SAIWSGFIKV KKSDEYTFAT SADNHVTMWV
 121 DDQEVINAKAS NSNKIRLEKG RLYQIKIQYQ RENPTEKGKD FKLYWTDSQN KKEVISSDNL
 181 QLPELKQKSS NSRKKRSTSA GPTVPDRDND GIPDSLEVEG YTVDVKNKRT FLSPWISNIH
 241 EKKGLTKYKS SPEKWSTASD PYSDFEKVTG RIDKNVSPEA RHPLVAAYPI VHVDMENIIL
 301 SKNEDQSTQN TDSQTRTISK NTSTSRTHTS EVHGNAEVHA SFFDIGGSVS AGFSNSNSST
 361 VAIDH3LSLA GERTWAETMG INTADTARLN ANIRYVNTGT APIYNVLPTT SLVLGKNQTL
 421 ATIKAKENQL SQILAPNNYY PSKNLAPIAL NAQDDFSSTP ITMNYNQFLE LEKTKQLRLD
 481 TDQVYVGNIA T YNFENGVRV DTGSNWSEVL PQIQETTARI IFNGKDLNLV ERRIAAVNPS
 541 DPLETTKPDML TLKEALKIAF GFNEPNGNLQ YQGKDITEFD FNFDQQTSQN IKNQLAELNA
 601 TNIYTVLDKI KLNKAMNLLI RDKRFHYDRN NIAVGADESV VKEAHREVIN SSTEGLLLNI
 661 DKDIRKILSG YIVEIEDTEG LKEVINDRYD MLNISSSLRQD GKTFIDFKKY NDKLPLYISN
 721 PNYKVNYYAV TKENTIINPS ENGDTSNTNGI KKILIFSKKG YEIG

[0878]

서열 번호 2 디프테리아 독소 NCBI 기준 서열: WP_003850266

1 MSRKLFASIL IGALLGIGAP PSAHAGADDV VDSSKSFVME NFSSYHGTKP GYVDSIQKGI
 61 QKPKSGTQGN YDDDWKGFYD TDNKYDAAGY SVDNENPLSG KAGGVVKVTY PGLTKVLALK
 121 VDNAETIKKE LGLSLTEPLM EQVGTEEFIK RFGDGASRVE LSLPFAEGSS SVEYINNWEQ
 181 AKALSVELEI NFETRGKRGQ DAMYEYMAQA CAGNRVRRSV GSSLSCINLD WDViRDKTKT
 241 KIESLKEHGP IKNKMSESPN KTVSEEKAKQ YLEEFHQTALEHPELSELKT VTGTNPVFAG
 301 ANYAAWAVNV AQVIDSETAD NLEKTTAALS ILPGIGSVMG IADGAVHHNT EEIVAQSIAL
 361 SSLMVAQAIP LVGELVDIGF AAYNFVESII NLFQVVFHNQY NRPAYSPGHK TQPFLHDGYA
 421 VSWNTVEDSI IRTGFQGESG HDIKITAENT PLPIAGVLLP TIPGKLDVNK SKTHISVNCR
 481 KIRMRCRAID GDVTFCRPKS PVYVGNGVHA NLHVAFHRS3 SEKIHSNEIS SDSIGVLGYQ
 541 KTVVDHTKVNS KLSLFFEIKS
 601 TNIYTVLDKI KLNKAMNLLI RDKRFHYDRN NIAVGADESV VKEAHREVIN SSTEGLLLNI
 661 DKDIRKILSG YIVEIEDTEG LKEVINDRYD MLNISSSLRQD GKTFIDFKKY NDKLPLYISN
 721 PNYKVNYYAV TKENTIINPS ENGDTSNTNGI KKILIFSKKG YEIG

[0879]

서열 번호 3 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A(PTx) NCBI 기준 서열: NP_ 249839

```

1 MHLTPHWIPL VASLGLLAGG SFASAAEEAF DLWNECAKAC VLSDLKGVRVS SRMSVDPATIA
61 DTNGQGVILHY SMVLEGGNDA LKLAIDNALS ITS DGLTIRL EGGVEPNKPV RYSYTRQARG
121 SWSLNWLVPPI GHEKPSNIKV FIHELNAGNQ LSHMSPIYTI EMGDELLAKL ARDATFFVRA
181 HESNEMQPTL AISHAGVSVV MAQAQPRREK RWSEWASGKV LCLLDPLDGV YNYLAQQRCN
241 LDDDTWEGKIIY RVLAGNPAKH DLDIKPTVIS HRLHFPEGGS LAALTAHQAC HLPLETFTRH
301 RQPRRGWEQLE QCGYPVQRLV ALYLAARLSW NQVDQVIRNA LASPGSGGDL GEAIREQPEQ
361 ARLALTLAAA ESERFVRQGT GNDEAGAASA DVVSLTCPVA AGECAFPADS GDALLERNYP
421 TGAEFLGDGG DISFSTRGTQ NWTVERLLQA HRQLEERGYV FVGYHGTFL AAQSIVFGGV
481 RARSQDLDIAI WRGFYIAGDP ALAYGYAQDQ EPDARGRIRN GALLRVYVPR SSLPGFYRTG
541 LTLLAAPEAAG EVERLIGHPL PLRLDAITGP EEEGGRLETI LGWPLAERTV VIPSAIPTDP
601 RNVGGDLDPS SIPDKEQAIS ALPDYASQPG KPPREDLK

```

[0880]

서열 번호 4 보툴리눔 독소 NCBI 기준 서열: YP_001386738

1 MFPVNQFNY KDPVNGVDIA YIKIPNAGQM QPVKAFKIHN KIWVIPERDT FTNPEEGDLN
 61 PPPEAKQVPV SYYDSTYLS DNEKDNYLKG VTKLFERIYS TDLGRMLLTS IVRGIPFWGG
 121 STIDTELKVI DTNCINVIQP DGSYRSEELN LVIIGPSADI IQFECKSFHG EVLNLTRNGY
 181 GSTQYIRFSP DFTFGFEESL EVDTNPLLGA GKFAFPFVLT LAHELIHAGH RLYGIAINPN
 241 RVFKVNTNAY YEMSGLEVSF EELRTFGGHD AKFIDSLQEN EFRLYYYNKF KDIASTLNKA
 301 KSIVGTTASL QIMKNVFKEK YLLSEDTSGK FSVDKLKFDK LYKMLTEIYT EDNFVKFFKV
 361 LNRKTYLNFD KAVFKINIVP KVNYTIYDGF NLRNTNLAAN FNGQNTTEINN MNFTKLKNFT
 421 GLFEFYKLLC VRGIITSKTK SLDKGYNKAL NDLCIKVNNW DLFFSPSEDN FTNDLNKGE
 481 ITSDTNIEAA EENISLDDIQ QYYLTFNFDN EPENISIENL SSDIIGQLEL MPNIERFPNG
 541 KKYELDKYTM FHYLRAQEF E HGKSRIALTN SVNEALLNPS RVYTFSSDY VKVKVNKATEA
 601 AMFLGWVVEQL VYDFTDETSE VSTTDKIADI TIIIPYIGPA LNIGNMLYKD DFVGALIFSG
 661 AVILLEFIPE IAIPVLTGTFA LVSYIANKVL TVQTIDNALS KRNEKWDEVY KYIVTNWLAK
 721 VNTQIDLIRK KMKEALENQA EATKAIINYQ YNQYTEEEKN NINFNIDDLS SKLNESINKA
 781 MININKFLNQ CSVSYLMNSM IPYGVKRLED FDASLKDALL KYIYDNRGTL IGGVDRLKDK
 841 VNNTLSTDIP FQLSKYVDNQ RLLSTFTEYI KNIINTSILN IRYESNHLID LSRYASKINI
 901 GSKVNFDPID KNQIQQLFNLE SSKIEVILKN AIVVNSMYEN FSTSFWIRIP KYFNSISLNN
 961 EYTIINCMEN NSGWKVSLNY GEIIWTLQDT QEIKQRVVFK YSQMINISDY INRWIFVTIT
 1021 NNRLNNNSKIY INGRLLIDQKP ISNLGNIHAS NNIMFKLDGC RDTHRYIWIW YFNLFDKELN
 1081 EKEIKDLYDN QSNSGILKDF WGDYLQYDKE YYMLNLYDPN KYVDVNNVGI RGYMYLKGR
 1141 GSVMTTNIYL NSSLYRGTKF IIKKYASGNK DNIVRNNDRV YINVVVKNKE YRLATNASQA
 1201 GVEKILSALE IPDVGNLSQLV VVMKSKNDQG ITNKCKMNLQ DNNGNDIGFI GFHQFNNIAK
 1261 LVASNWYNRQ IERSSRTLGC SWEFIFVDDG WGERPL

[0881]

서열 번호 5 과상품 독소

NCBI 기준 서열: WP_023439719

1 MPITINNFRY SDPVNNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIWIVPERY EFGTKPEDFN
 61 PPSSLIEGAS EYYDPNYLRT DSDKDRFLQT MVKLFNRIKN NVAGEALLDK IINAIPYLG
 121 SYSLDKFDT NSNSVSFNLS EQDPSGATTK SAMLTNLIIIF GPGPVLNKNE VRGIVLRVDN
 181 KNYFPCRDGF GSIMQMAFCP EYIPTFDNVI ENITSLTIGR SKYFQDPALL LMHELIHVLH
 241 GLYGMQVSSH EIIIPSKQEIIY MQHTYPISAE ELFTFGGQDA NLISIDIKNL LYEKTLDYK
 301 AIANKLSQVT SCNDPNIDID SYRKQIYQQKY QFDKDSNGQY IVNEDKFQIL YNSIMYGFTE
 361 IELGKKFNIK TRLSYFSMNH DPVKIPNLDD DTIYNDTEGF NIESKDLKSE YKGQNMRVNT
 421 NAFRNVDGSG LVSKLIGLCK KIIPPTNIRE NLYNRTASLT DLGGELCIKI KNEDLTFIAE
 481 KNSFSEEPFQ DETVSYNTKN KPLNFNYSLD KIILDYNLQS KITLPNDRTT PVTKGIPYAP
 541 KYKSNAASTI EIHNIIDNTI YQYIYAQKSP TTLQRITMTN SVDDALINST KIYSYFPSVI
 601 SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK TTIDKISDV3 TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN
 661 FIGALETTGV VLLYEIPEI TLPVIAALSI AESSTQREKI IKTIDNFLEK RYEKWIEVYK
 721 LIKAKWLGTV NTQFQKRSYQ MYRSLEYQVD AIKKIIDYEY KIYSGPDKEQ IADEINNLKN
 781 KLEEKANKAM ININIFMRES SRSFLVNQMI NEAKKQLLEF DTQSKNILMQ YIKANSKFIG
 841 ITELKKLESK INKVFSTPIP FSYSKNLDCW VDNEEDIDVI LKKSTILNLD INNDIISDIS
 901 GFNSSVITYP DAQLVPGING KAIHLVNNE SEVIVHKAMD IEYNDMFNNF TVSFWLRVPK
 961 VSASHLEQYG TNEYSISSM KKYSLSIGSG WSVSLKGNNL IWTLKDSAGE VRQITFSDL
 1021 DKFNAYLANK WVFITITNDR LSSANLYING VLMKNAEITG LGAIREDNNI TLKLDRCNNN
 1081 NQYVSIDKFR IFCKALNPKE IEKLYTSYLS ITFLRDFWGN PLRYDTEYYL IPVASSSKDV
 1141 QLNITDYM LTNAFSPYTNG KLNIIYRRLY SGLKFTIIRR TPNNEIDSFV KSGDFIKLYV
 1201 SYNNNEHIVG YPKDGNAFNN LDRILRVGYN APGIPLYKKM BAVKLRLDLKT YSVQLKLYDD
 1261 KNAASLGLVGI RNGQIGNDPN RDILIASNWY FNHLKDRTLT CDWYFVPTDE GWTND

[0882]

서열 번호 6 부종 인자

NCBI 기준 서열: NP_052818

1 MTRNKFIPNK FSIISFSVLL FAISSSQIAIE VNAMNEHYTE SDIKRKHTE KNKTEKEKFK
 61 DSINNLVKTE FTNETLDKIQ QTQDLLKKIP KDVLEIYSEL GGEIYFTDID LVEHKELODL
 121 SEEKNSNMNS RGEKVPFASR FVFEKKRETP KLIINIKDYA INSEQSREVY YEIGKGISLD
 181 IISKDKSLDP EFLNLIKSLS DDSDSSDLLF SQKFKEKLEL NNKSIDINFI KENLTEFQHA
 241 FSLAFSYYFA PDHRTVLELY APDMFEYMNK LEKGGFEKIS ESLKREGVEK DRIDVLKGEK
 301 ALKASGLVPE HADAFKKIAR ELNTYILFRP VNKLATNLIK SGVATKGLNV HGKSSDWGPV
 361 AGYIPFDQDL SKKHGQQQLAV EKGNLENKKS ITEHEGEIGK IPLKLDHLRI EELKENGIIL
 421 RGKKEIDNGK KYYLLESNNQ VYEFRISDEN NEVQYKTKEG KITVLGEKFN WRNIEVMAKN
 481 VEGVLKPLTA DYDLFALAPS LTEIKKQIPQ KEWDKVVNTP NSLEKQKGVT NLLIKYGIER
 541 KPDSTKGTLS NWQKQMLDRL NEAVKYTGTY GGDVNVHGTE QDNEEFFPEKD NEIFIINPEG
 601 EFILTKNWEM TGRFIEKNIT GKDYLYYFNR SYNKIAFGNK AYIEWTDPIT KAKINTIPTS
 661 AEFIKNLSSI RRSSNVGVYK DSGDKDEFACK KESVKKIAGY LSDYYNSANH IFSQEKKRKI
 721 SIFRGIQAYN EIENVLKSKQ IAPEYKNYFQ YLKERITNQV QLLLTHQKSN IEFKLLYKQL
 781 NFTENETDNF EVFQKIIIDEK

[0883]

서열 번호 7 치사 인자

NCBI 기준 서열: NP_052803

1 MNICKEFIKV ISMSCLVTAI TLSGPVFIPL VQGAGGHGDV GMHVKEKEKN KDENKRKDEE
 61 RNKTQEEHLK EIMKHIVKIE VRGEEAVKKE AAEKLLEKVP SDVLEMYKAI GGKIYIVDGD
 121 ITKHISLEAL SEDKKKIKDI YGKDALLHEH YVYAKEGYEP VLVIQSSEDY VENTEKALNV
 181 YYEIGKILSR DILSKINQPY QKFIDVLNTI KNA8SDSDGQD LLFTNQLKEH PTDFSVEFLE
 241 QNSNEVQEVF AKAFAYYIEP QHRDVQLQYA PEAFNYMDKF NEQEINLSLE ELKDQRMLSR
 301 YEKWEKIKQH YQHWSDSLSE EGRLLKKLQ IPIEPKKDDI IHSLSQEEKE LLKRIQIDSS
 361 DFLSTEEKEF LKKLQIDIRD SLSEEEKELL NRQVQDSSNP LSEKEKEFLK KLKLDIQPYD
 421 INQRLQDTGG LIDSPSTINLD VRKQYKRDQ NIDALLHQSI GSTLYNKIYL YENMNIINNLT
 481 ATLGADLVDS TDNTKINRGI FNEFKRNFKY SISSNYMIVD INERPALDNE RLKWRQLSP
 541 DTRAGYLENG KLILQRNIGL EIKDYQIIKQ SEKEYIRIDA KVVPKSKIDT KIQEAQLNIN
 601 QEWNKALGLP KYTKLITFNV HNRYASNIVE SAYLILNEWK NNIQSDLIKK VTNYLVDGNG
 661 RFVFTDITLP NIAEQYTHQD E1VEQVHSKG LYVPESRSL LHPGSKGVEL RNDSEGFIHE
 721 FGHAVDDYAG YLLDKNQSDL VTNSKKFIDI FKEEGSNLTS YGRTNEAEFF AEAFLRMHST
 781 DHAERLKVKQK NAPKTFQFIN DQIKFIINS

[0884]

서열 번호 8 ω -코노톡신 M VII A NCBI 기준 서열: ADB93081

1 MRKLCVVIVAVLLLTAQQLI TADDSRGQTQK HRALR3TTKL SMSTRCKGKG AKCSRLMYDC
61 CTGSCR8GKC G

서열 번호 9 μ -코노톡신 스위스-프로트: P15472.1

1 ACSGRGSRCP PQCCMGLRCG RGNPQKCIGA HEDV

서열 번호 10 δ -코노톡신 NCBI 번호: AKD43185

1 LNKRCAGIGS FCGLPGLVDC CSGRCFIVCL P

[0885]

서열 번호 11, 쇠가 독소 A-파트:

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLIVERNNLY
VTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH3GTSLTQSV
ARAMLRFVTVAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINA
ILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFFSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

[0886]

서열 번호 12, 쇠가 독소 B-파트:

[0887]

외독소 A, A-파트 및 B-파트

서열 번호 13

AEEAFDLWNNECAKACVLDLKDGVRSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDGLTIRLEG
GVEPNKPVRYSYTRQARG3WSLNWLVP1GHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVR
AHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVNYLAQQRCNLDDTWEGK1YRVLAGN
PAKHLDIPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARL8WNQV
DQVIRNALASPG8GGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANADVVSLLTCPVAAGECAGPADS
GDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQ8IVFGGVRARSQDL
DAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEFDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRL
DAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVVIPSIAITDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAI5ALPDYASQPGKPPREDLK

[0888]

콜레라 독소

서열 번호 14, 콜레라 독소, A1 성분

NDDKLYRADSRPPDEIKQSGGLMPRGQSEYFDRGTQMNINLYDHARGTQTGFVRHDDGYVSTSISLRS AHLVGQTI
SGH3TYLYVLATAPNMVNNDVLGAYSPHPDEQEVSALGGIPY8QIYGWYRVHFGVLDEQLHRNRYDRYYSNLD
IAPAAADGYGLAGFPPEHRAWREEPWIHHAPPGCNAPRSS

서열 번호 15, 콜레라 독소, A2 성분

MSNTCDEKTQSLGVKFLDEYQ8KVKRQIFSGYQSDIDTHNRIKDEL

서열 번호 16, 콜레라 독소, B 성분

TPQNITDLCAEYHNTQIYTLNDKIFSITESLAGKREMAIITFKNGAIFQVEVPSSQHIDSQKKA
[0889] IERMKDTLRIAYLTEA KVEKLCTWNNKTPHAIAAISMAN

서열 번호 17, 과상풍의 촉매 사슬 (L-사슬 서열)

MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNPPSS
LIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPIYLGNSYSLLDKF
DTNSNSVFSNLLEQDPMSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNKNYFPCRDFGFS
IMQMAFCPEYVPTFDNVENITSLTIGSKYFQDPALLMHELIHVHGLYGMQVSSHEIIPSK
QEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNNDLYEKTLNIDYKAIANKLSQVTSCNDPNIDID
SYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTEIELGKKFNKTRLSYFSMNHDPVK
IPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNMRVNTNAFRNVDGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNI
RENLYNRT
[0890]

리신 독소

서열 번호 18, 리신 독소, A 성분

IFPKQYPIINFTTAGATVQSYTNFIRAVRGRLLTGADVRHEIPVLPNRVGLPINQRFILVELSNHAELSVTLALDV
NAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNRYTFAGGGNYDRLEQLAGNLRENIELGNGPLEEAISALYYY
STGGTQLPLTLARSFTIICIQMISEAARFQYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGRSTAQESNQGAFASPIQ
LQRNGSKFSVYDVSILIPITIALMVYRCAPPSSQF

서열 번호 19, 리신 독소, B 성분

ADVCMDEPEPIVIRIVGRNGLCVDVVRDGRFHNGNATQLWPCKSNTDANQLWTLKRDNNTIRSNKGCLTTYGYS
YDCNTAATDATRWQIWDNGTIINPRSSLVLAATSGNSGTTLTQTNQIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQA
NSGQVWIEDCSSEKAEQOWALYADGSIRPQQNRDNCLTSNSNIRETVVKILSCGPASSGQRWMFKNDGTILNLYSGL
VLDVRASDPSLKQIIILYPLHGDPNQIWLPF
[0891]

서열 번호 20, BTx-A 경쇄(네이티브): BTx-A 아미노산 1-448

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWVI PERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTY
LSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVQPDGSYRSEEINLVII
GPSADIIQFECKSFGHEVNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHR
LYGIAINPNRPFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTA
SLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFCKMLTEIYTEDNFVKKFKVLNRKTYLNFDFKAVFKINIVPKVNYT
IYDGFNLRNTNLAANFNGQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNK

[0892]

서열 번호 21, BTx-A 경쇄 아미노산 1-430

MPFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWVI PERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSYYDSTY
LSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVQPDGSYRSEEINLVII
GPSADIIQFECKSFGHEVNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHR
LYGIAINPNRPFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTA
SLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKFCKMLTEIYTEDNFVKKFKVLNRKTYLNFDFKAVFKINIVPKVNYT
IYDGFNLRNTNLAANFNGQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLC

[0893]

서열 번호 22, BTx-B 경쇄(네이티브): BTx-B 아미노산 1-441

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGIFNRDVCEYYDPD
YLNTNDKKNIFLQTMKILFNRIKSKPLGEKLLMEDIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASTVVKLISNPGEVERKKGI
FANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASTREGFGGIMQMFKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHE
LIHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKEFFMQSTDIAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLV
CISDPNNININIIYKNKFKDKYKFV ред. SEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKN
LLDNEIYTIEEGFNIISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVK

[0894]

서열 번호 23, BTx-B 아미노산 1-437

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGIFNRDVCEYYDPD
YLNTNDKKNIFLQTMKILFNRIKSKPLGEKLLMEDIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASTVVKLISNPGEVERKKGI
FANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASTREGFGGIMQMFKFCPEYVSVFNNVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHE
LIHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKEFFMQSTDIAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNKVLV
CISDPNNININIIYKNKFKDKYKFV ред. SEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKN
LLDNEIYTIEEGFNIISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVK

[0895]

서열 번호 24, BTx-C1 경쇄(네이티브): BoN/T-C1 아미노산 1-449

MPITINNFNYSDPVNDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRF3RNSNPNLNPFRVTSPKSGYYDPNVL
STDSDKDPFLKEIIKLFKRIN3REIGEELIYRLSTDIPFPGNNTNPINTFDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTGSINP
SVIITGPRENIIDPETSTFKLNTNTFAAQEGFGALSIIISISPRFMLYTSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHEL
NHAMHNLYGIAIPNDQTLISVDSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSAKYFEEKALDYYRSIAKRLNSIT
TANPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTVRNKFVELYNELTQIFTEFNYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTA
NILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLSPALRKVNPNENMLYLFCKFCHKAIDGRSLYNK

[0896]

서열 번호 25, BTx-D 경쇄(네이티브): BoN/T-D 아미노산 1-442

MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKEYQSYDPNVL
STDEQKDTFLKGIIKLFKRINERD1GKKLINVYLVGSPFMGDSSTP6DTDFTRHTTNIAVEKFENG8WKVTNIITP
SVLIFGPLPNILDYTA8LTLQGQQSNPSEGFGTLSILKVAPEFLLTFSVTSNQSSAVLGK5IFCMDPVIALMHEL
THSLHQLYGINIPSDKIRPQVSEGFFSDGPNVQFEELYTFGGDVEIIIPQIERSQLREKALGHYKDIAKRLNNIN
KTIPSS8W18N1DKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVN1DKFNSLYSDLTNVMSSEVYSSQYNVKNRTHYF3RHYLPVFA
NILDDNIYTIRDGFNLTNKGFIENSGQNIERNPALKLSSSESVVDFLFTKVCLRLTK

[0897]

서열 번호 26, BTx-E 경쇄(네이티브): BTx-E 아미노산 1-422

MPTINSFNYNDPVNNRTILYIKPGGCQQFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTIPQDFLPPTSLKNGDSSYYDPNYLQSD
QEKDCKFLKIVTKIFFNRRINDNLSGRILLEELSKANPYLGNDNTPDGFIDFIINDASAVPIQFSNGSQSILLPNVIIMGAE
PDLFETN33NISLRNNYIMPSNHGFGSTIAITFSPEYSFRFKDNMNEFIQDPALTLMHELIHSLHGLYGAKGITTGY
TITQKQNPLITNIRGNTNIEEFLTFGGTDLNIIITSAQSNIDYTNLLADYKKIASL8KQVSNPLLNPKDVFREAKYG
LDKDASGIYSVNINKFNDIFKKLYSFTEFDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFKL8NLLNDSIYNISEGYNINNLKVNFR
GQANANLNFPRIITPITGRGLVKKIIRFCKNIVSVKGIR

[0898]

서열 번호 27, BTx-F 경쇄(네이티브): BTx-F 아미노산 1-436

MPVAINSFNYNDPVNDDTILYIMQIPYEEKSKYYKAFEIMRNVWIIPERNTIGTNPSDFDPPASLKNGSSAYYDPNY
LTTDAERDRYLTTIKLFLKRINSNPAGKVLQEIYAKPYLGNDHTPIDEFSPVTRTTSVNKLSTNVESSMLLNLL
VLGAGPDIFESCCYPVRKLIDPDVYIDPSNYGFGSINIVTFSPPEYEYTFNDISGGHNSTESFIADPAISLAHELIH
ALHGLYGARGVTYEEETIEVKQAPIMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNNLLANYEKIATRLSEVNSAP
PEYDINEYKDYFQWKYGLDKNAKGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTESDLANKFKVKCRNTYFIKYEFLKVPNLLDDDI
YTVSEGPNIGNLAVNNRGQS1KLNPK11DS1PDKG1LVEK1VKFC1SV1PRK

[0899]

서열 번호 28, BTx-G 경쇄(네이티브): BTx-G 아미노산 1-442

MPVNIKXFNYNDPINNDDIIMMPEFNDPGPGTYYKAFRIIDRIWIVPERFTYGFQPDQFNASTGVFSKDVYEEYDPT
YLKTDAAEKDKFLKTMKLFNRRINSKPSGQRLLDMIVDAIPYLGNASTPPDKFAANVANSINKIIQPGAEQIKGL
MTNLLIFGPGPVLSDNFTDSIMNGHSPISEGFGARMMIRFCPSCLNVFNNVQENKDTSIFSRRAYFADPAITLMHE
LIHVLHGLYGIKISNLPITPNTKEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDPSPVISPSTDMNIYNKALQNFQDIANRLNIVSS
AQGSGIDISLYKQIYKKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALMFGFTETNLAGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKL
LDNTIYTQNEGFIASKNLKTEFNGQNKAVNKEAYEEISLEHLVIYRIAMCKPVMYK

[0900]

서열 번호 29, BTx-A(경쇄 및 중쇄 전위 도메인) 아미노산 1-872

MPFVNQKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMQPVKAFKIHNKIWIWIPERDTFTNPEEGDLNPPEAKQVPV8YYDSTY
LSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVII
GPSADIIQFECKSFGEVNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLIGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHR
LYGIAINPNRVRFKVNTNAYYEMSGLEVSEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTA
SLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKDLYKMLTEIYTEDNFVKKFKVLRKTYLNFDFKAVFKINIVPKVNYT
IYDGFNLRNTNLAANFNGQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLC1KVNNWDL
FFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIIQYYLTNFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPN
GKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVTFFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTD
ETSEVSTTDKIADITIIIPYIGFALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTQ
TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYQYTEEKNNINFNIDDLS
SKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLST
DIPFQL3KYVDNQRLLSTFTEYIKN

[0901]

서열 번호 30, BTx-A(경쇄 및 중쇄 전위 도메인) 아미노산 1-842

MPFVNQKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMQPVKAFFKIHNKIWIWVPERDTFTNPEEGDLNPPEAKQVPV3YYDSTY
 LSTDNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEEINLVII
 GPSADIIQFECKSFGHEVNLNTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELIHAGHR
 LYGIAINPNRVRFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTA
 SLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDKLKDLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYT
 IYDGFNLRNTNLAANFNGQNTIEINNMNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSKTSLDKGYNKALNDLCIKVNNWDL
 FFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLTIQYYLTNFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPN
 GKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVNVKATEAMFLGWVEQLVYDFTD
 ETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGAJLIFSGAVILLEFPIEIAIPVLTGTFALVSYIANKVLTVO
 TIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEKNNNINFNIDDLS
 SKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVN

[0902]

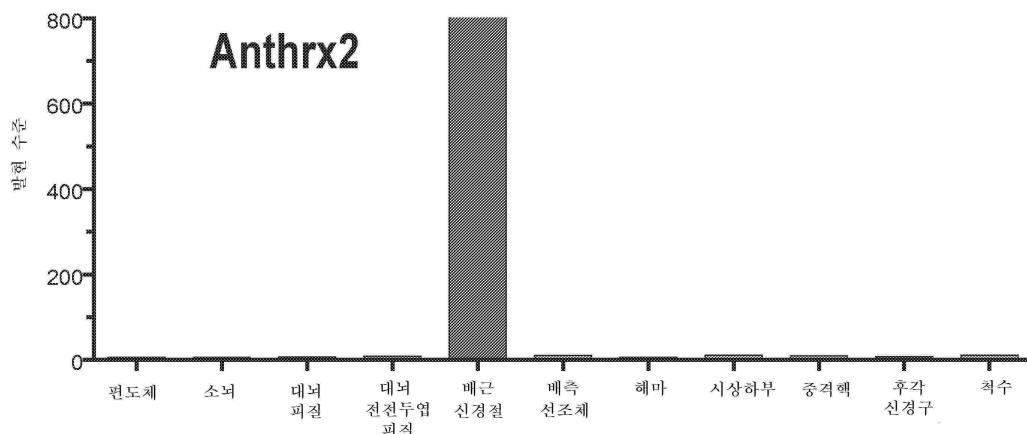
서열 번호 31, BTx-B(경쇄 및 중쇄 전위 도메인) 아미노산 1-863

MPVTINNFNY NDPIDNNNII MMEPPFARGT GRYYKAFKIT DRIWIIPERY TFGYKPEDFN KSSGIFNRDV
 CEYYDPDYLN TNDKKNIFLQ TMIKLFNRIK SKPLGEKLLE MIINGIPYLG DRRVPLEEFN TNIASVTVNK
 LISNPGEVER KKGIFANLII FGPGPVLEN ETIDIGIQNH FASREGFGGI MQMKFCPEYV SVFNNVQENK
 GASIFNRRGY FSDPALILMH ELIHVLHGLY GIKVDDLPIV PNEKKFFMOS TDAIQAEELY TFGGQDPSII
 TPSSTDKSIYD KVLQNFRGIV DRINKVLVCI SDPNININIIY KNKFKDKYKF VEDSEGKYSI DVESFDKLYK
 SLMFGFTETN IAENYKIKTR ASYFSDLPP VKIRNLLDNE IYTIEEGFNI SDKDMKEYR GQNKAINKQA
 YEEISKEHLA VYKIQMCKSV KAPGICIDVD NEDLFFIADK NSFSDDLSKN ERIEYNTQSN YIENDFPINE
 LILDSDLISK IELPSENTE LTDFNVDVPV YERQPAIKKI FTDENTIFQY LYSQTFPLDI RDISLTSSFD
 DALLFSNKVY SFFSMDYIKT ANKVVEAGLF AGWWKQIVND FVIEANKSNT MDKIADISLI VPYIGLALNV
 GNETAKGNFE NAFEIAGASI LLEFIPPELLI PVVGAFLLES YIDNKNKIIK TIDNALTAKRN EKWSDMYGLI
 VAQWLSTVNT QFYTIKEGMY KALNYQAQAL EEEIKYRYNI YSEKEKSNNIDFNDINSKL NEGINQADIN
 INNFINGCSV SYLMKKMIP AVEKLDDFDN TLKKNLLNYI DENKLYLIGS AEYEKSKVNK YLKTIIMPFDL
 SIYTNDTILI EMFNKYNSEI LNN.

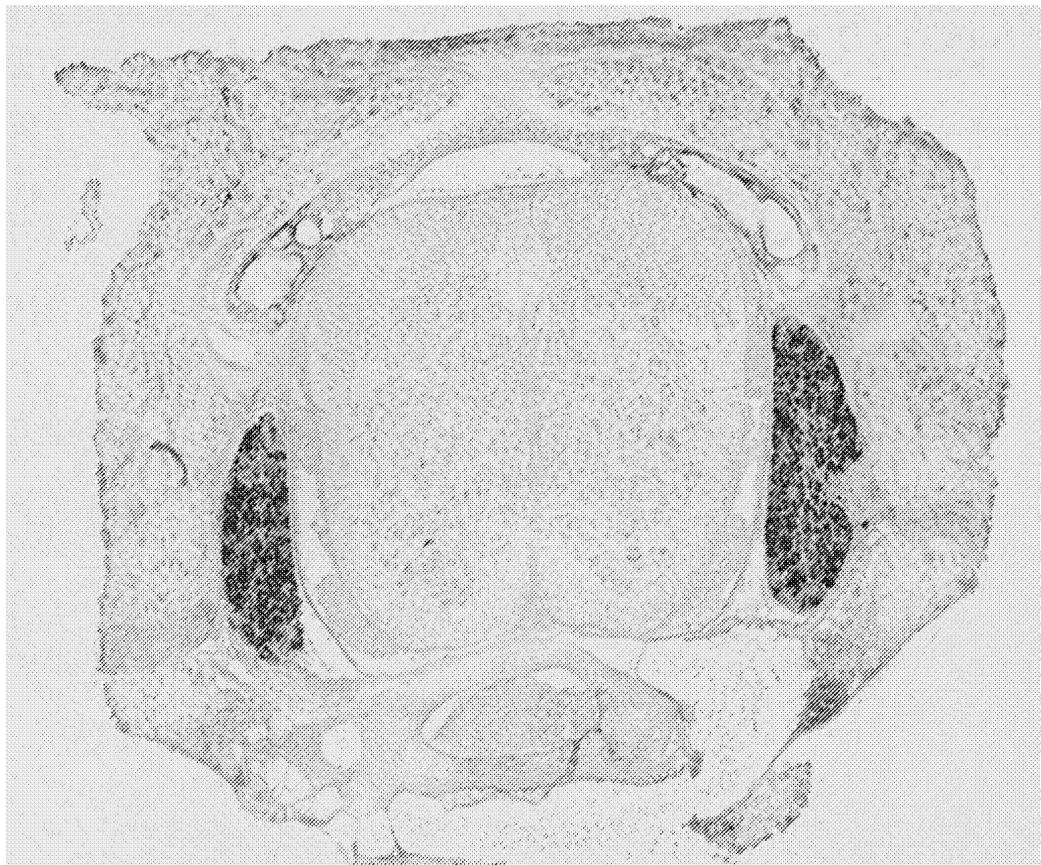
[0903]

도면

도면1a

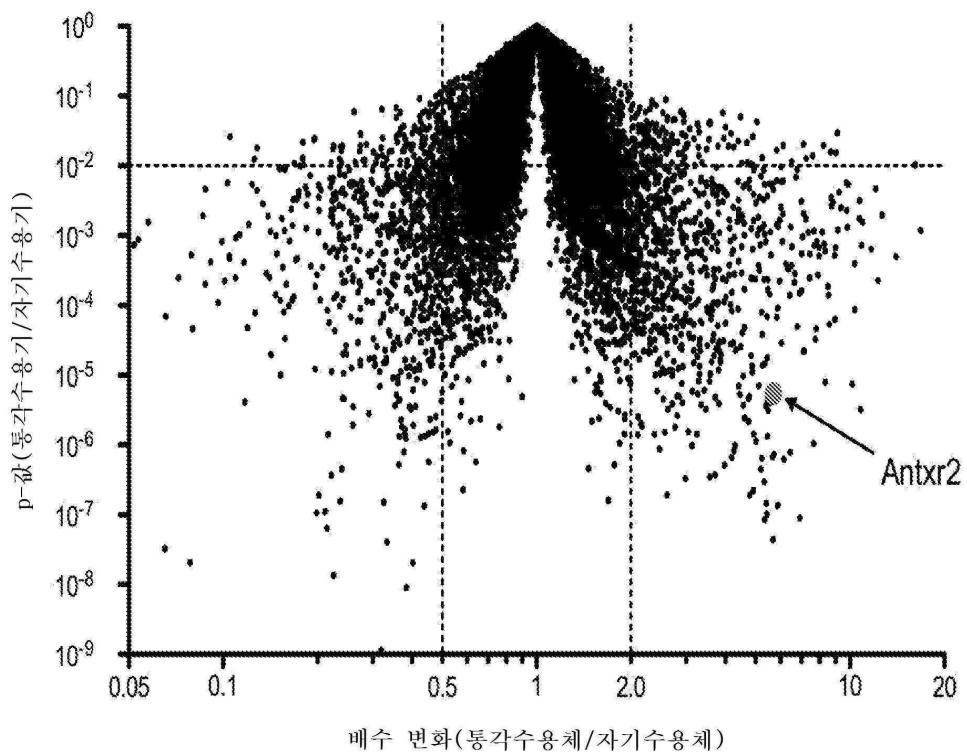


도면1b



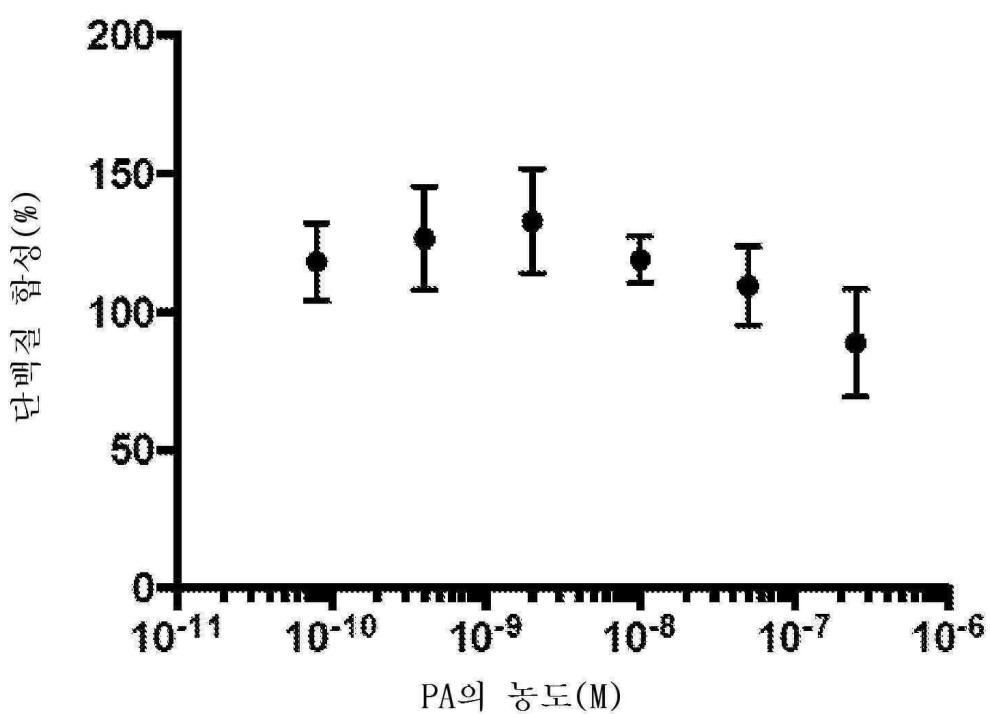
도면2

통증 감지 뉴런에서의 ANTXR2 발현

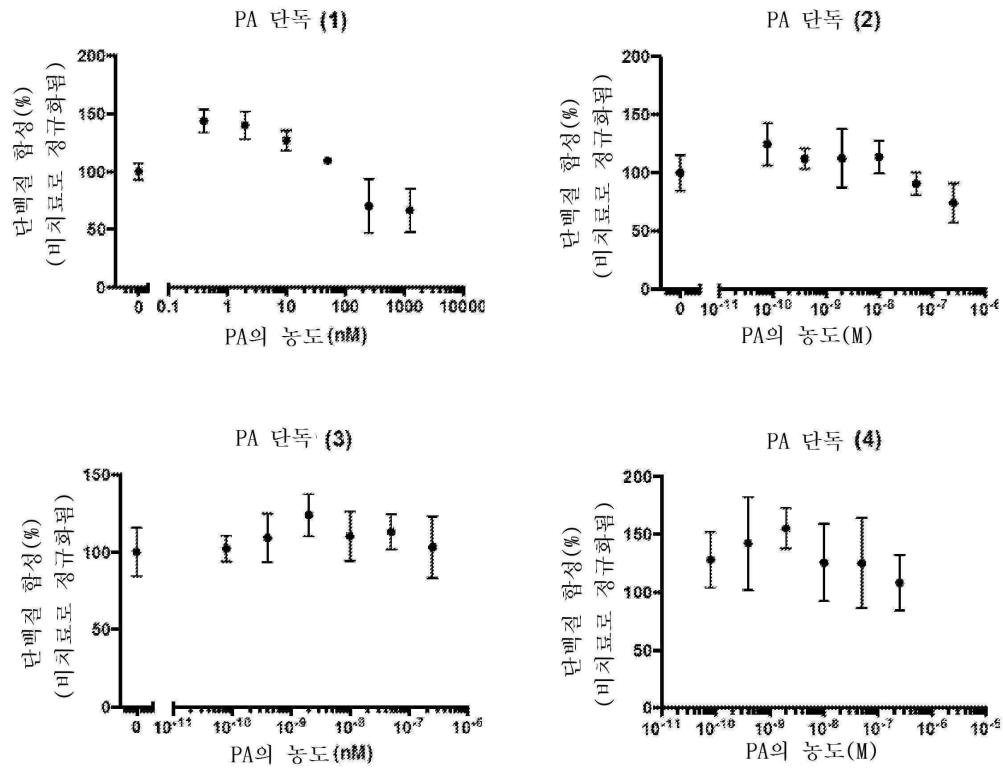


도면3

PA 단독

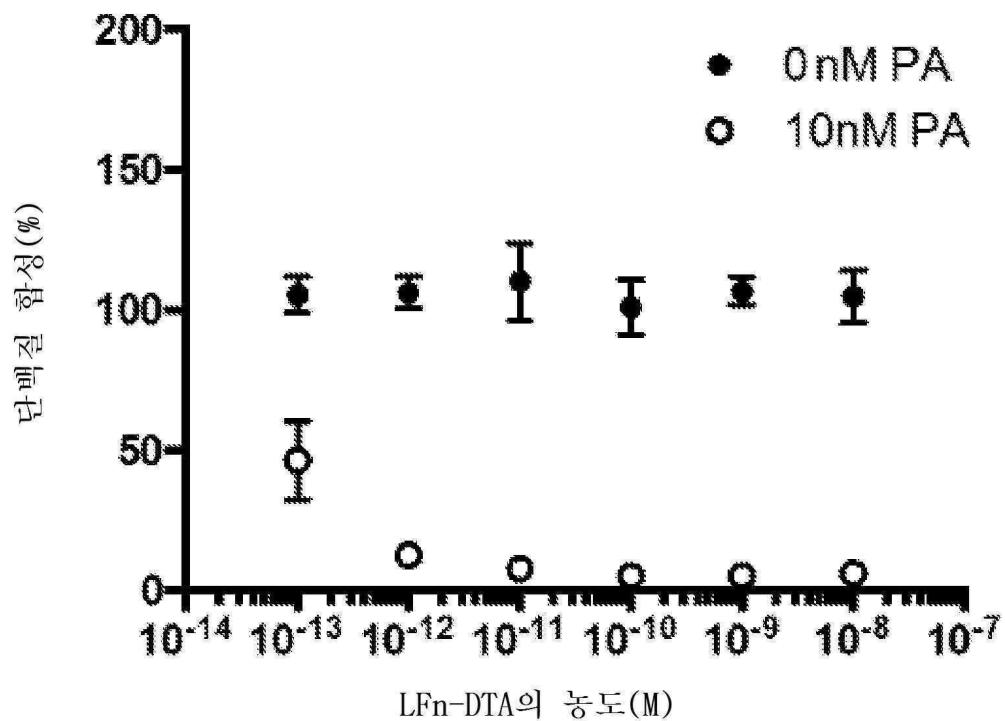


도면4

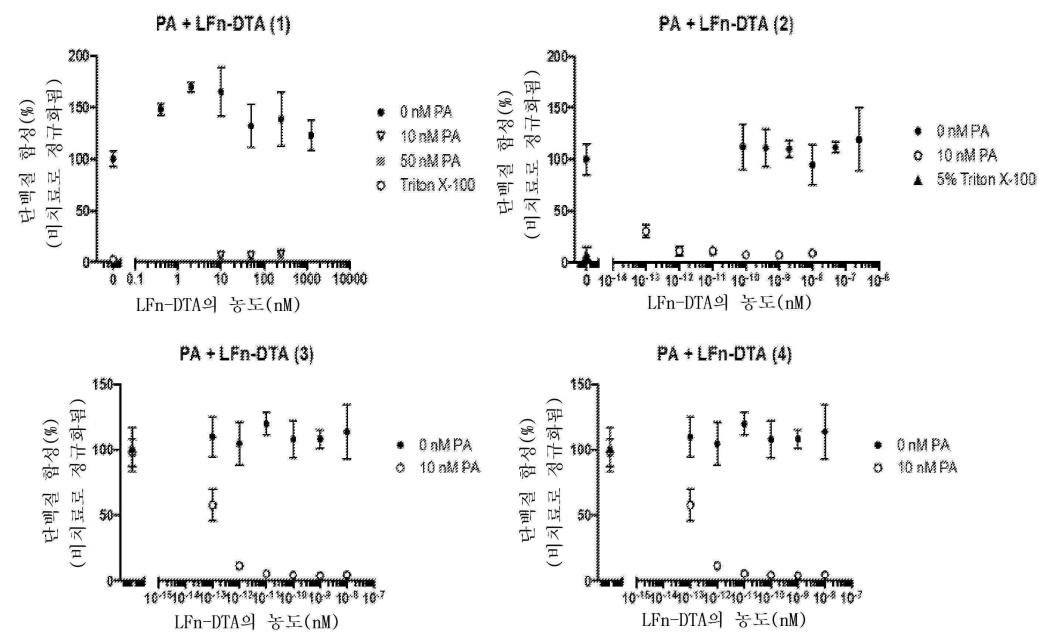


도면5

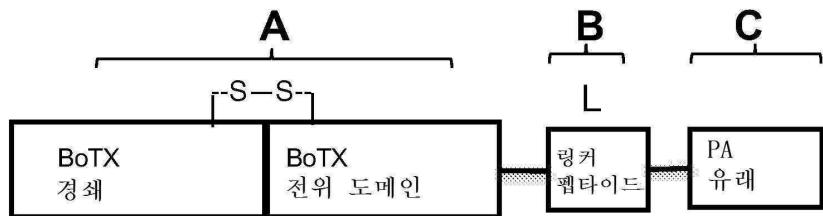
PA + LFn-DTA



도면6



도면7a



A: 기공 형성 및 전위에
필요한 보툴리눔 신경독소
경쇄 및 중쇄의 일부

1. BoNT/A (a.a. 1-872)
2. BoNT/A (a.a. 1-842)
3. BoNT/B (a.a. 1-863)

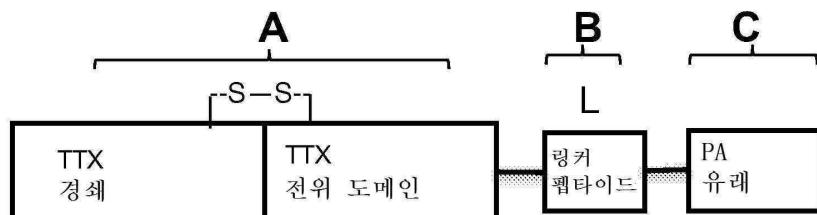
B:

링커

C:

1. PA 도메인 4 (PA a.a. 596-735)
2. 퓨린 절단 부위에 대한
PA 돌연변이체

도면7b



A: 전위를 책임지는
파상풍 독소(TeNT) 경쇄(또는
사슬 A) 및 중쇄(또는 사슬 B)의 일부

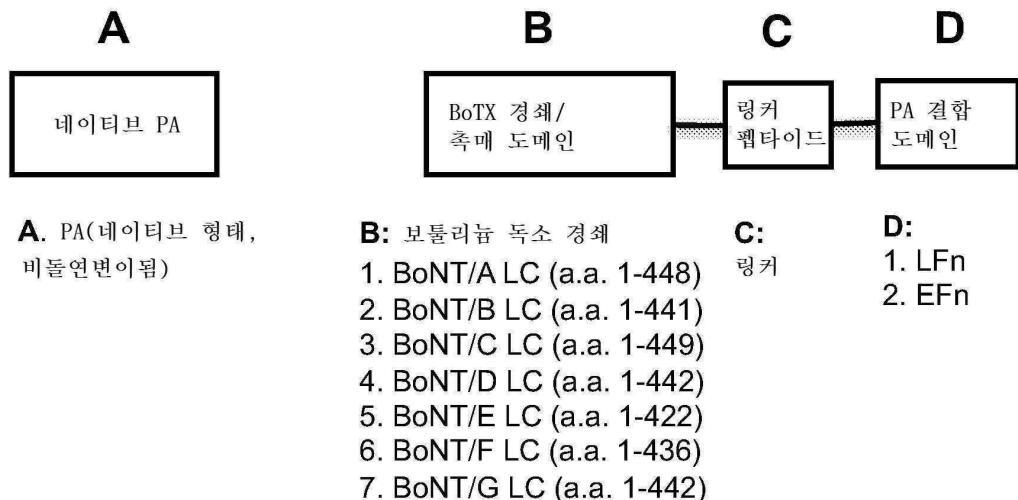
B:

링커

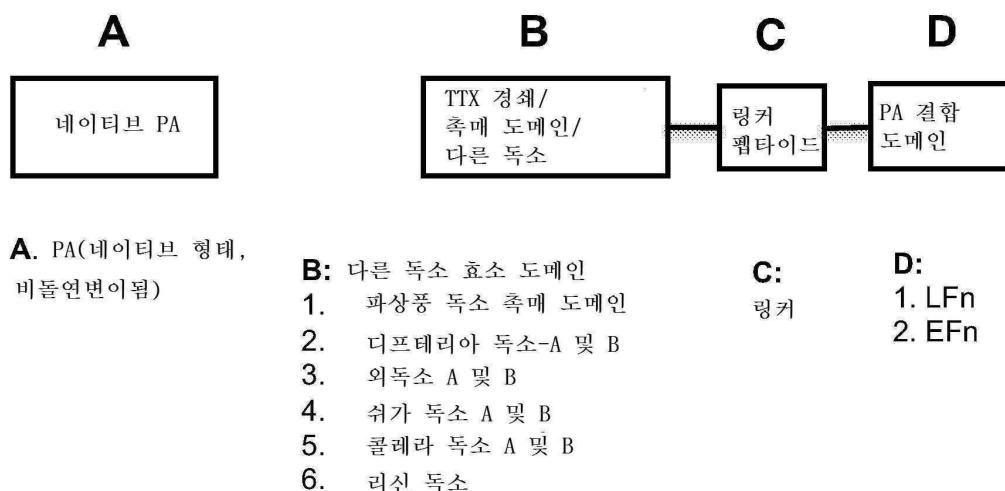
C:

1. PA 도메인 4 (PA a.a. 596-735)
2. 퓨린 절단 부위에 대한
PA 돌연변이체

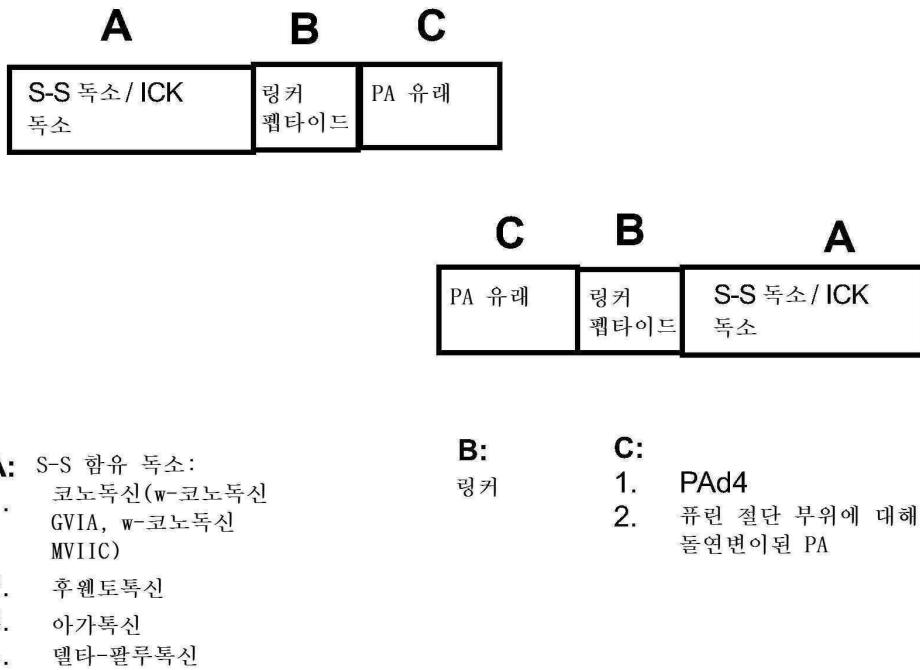
도면8a



도면8b



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT OF PAIN

<130> WO2017/035507

<140> PCT/US2016/049099

<141> 2016-08-26

<150> US 62/210,610

<151> 2015-08-27

<160> 148

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 764

<212> PRT

<213> *Bacillus anthracis*

<400> 1

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile

1	5	10	15
Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys			
20	25	30	
Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Gln Gly Leu			
35	40	45	
Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val			
50	55	60	
Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu			
65	70	75	80
Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly			
85	90	95	
Phe Ile Lys Val Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala			
100	105	110	
Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys			
115	120	125	
Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln			
130	135	140	
Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp			
145	150	155	160
Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser			
165	170	175	
Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser			
180	185	190	
Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp			
195	200	205	
Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp			
210	215	220	
Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His			
225	230	235	240
Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser			
245	250	255	

Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile

260 265 270

Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr

275 280 285

Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu

290 295 300

Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys

305 310 315 320

Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala

325 330 335

Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly

340 345 350

Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser

355 360 365

Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala

370 375 380

Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr

385 390 395 400

Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys

405 410 415

Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln

420 425 430

Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile

435 440 445

Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn

450 455 460

Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp

465 470 475 480

Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly

485 490 495

Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln

500	505	510
Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn		
515	520	525
Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu		
530	535	540
Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe		
545	550	555
Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile		
565	570	575
Thr Glu Phe Asp Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys		
580	585	590
Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp		
595	600	605
Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg		
610	615	620
Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val		
625	630	635
640		
Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu		
645	650	655
Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile		
660	665	670
Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg		
675	680	685
Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe		
690	695	700
Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn		
705	710	715
720		
Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile		
725	730	735
Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys		
740	745	750

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly

755 760

<210> 2

<211> 560

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 2

Met Ser Arg Lys Leu Phe Ala Ser Ile Leu Ile Gly Ala Leu Leu Gly

1 5 10 15

Ile Gly Ala Pro Pro Ser Ala His Ala Gly Ala Asp Asp Val Val Asp

20 25 30

Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr

35 40 45

Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys

50 55 60

Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser

65 70 75 80

Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn

85 90 95

Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly

100 105 110

Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys

115 120 125

Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly

130 135 140

Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val

145 150 155 160

Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn

165 170 175

Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe

180 185 190

Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala

195 200 205

Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu

210 215 220

Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr

225 230 235 240

Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser

245 250 255

Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu

260 265 270

Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu

275 280 285

Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala

290 295 300

Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp

305 310 315 320

Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly

325 330 335

Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu

340 345 350

Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala

355 360 365

Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn

370 375 380

Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr

385 390 395 400

Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His

405 410 415

Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg

420 425 430

Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu

435

440

445

Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly

450

455

460

Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg

465 470 475 480

Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys

485 490 495

Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu

500 505 510

His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu

515

520

525

Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp

530 535 540

His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser

545 550 555 560

<210> 3

<211> 638

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

Met His Leu Thr Pro His Trp Ile Pro Leu Val Ala Ser Leu Gly Leu

1 5 10 15

Leu Ala Gly Gly Ser Phe Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu

20 25 30

Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val

35 40 45

Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly

50 55 60

Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu

85	90	95	
Thr Ile Arg Leu Glu Gly Val Glu Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr			
100	105	110	
Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val			
115	120	125	
Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn Ile Lys Val Phe Ile His Glu			
130	135	140	
Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile			
145	150	155	160
Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe			
165	170	175	
Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile			
180	185	190	
Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg			
195	200	205	
Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu			
210	215	220	
Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn			
225	230	235	240
Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn			
245	250	255	
Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys Pro Thr Val Ile Ser His Arg			
260	265	270	
Leu His Phe Pro Glu Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln			
275	280	285	
Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg			
290	295	300	
Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val			
305	310	315	320
Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val			
325	330	335	

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu
 340 345 350
 Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
 355 360 365
 Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
 370 375 380
 Ala Gly Ala Ala Ser Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala
 385 390 395 400

 Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
 405 410 415
 Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Asp Ile
 420 425 430
 Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
 435 440 445
 Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
 450 455 460

 His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
 465 470 475 480
 Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
 485 490 495
 Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
 500 505 510
 Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
 515 520 525

 Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala
 530 535 540
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
 545 550 555 560
 Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Arg
 565 570 575
 Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile

580 585 590

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp

595 600 605

Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp

610 615 620

Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

625 630 635

<210> 4

<211> 1296

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 4

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Ala Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145	150	155	160
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr			
165	170	175	
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe			
180	185	190	
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu			
195	200	205	
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu			
210	215	220	
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn			
225	230	235	240
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu			
245	250	255	
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys			
260	265	270	
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn			
275	280	285	
Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val			
290	295	300	
Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys			
305	310	315	320
Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu			
325	330	335	
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp			
340	345	350	
Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn			
355	360	365	
Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr			
370	375	380	
Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn			
385	390	395	400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu

485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu

515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu

530 535 540

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu

545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys

580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu

645	650	655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala		
660	665	670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys		
675	680	685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu		
690	695	700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys		
705	710	715
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu		
725	730	735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn		
740	745	750
Gln Tyr Thr Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp		
755	760	765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile		
770	775	780
Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met		
785	790	795
Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys		
805	810	815
Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly		
820	825	830
Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp		
835	840	845
Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser		
850	855	860
Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn		
865	870	875
Leu Arg Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser		
885	890	895

Lys Ile Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn

900 905 910

Gln Ile Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu

915 920 925

Lys Asn Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser

930 935 940

Phe Trp Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn

945 950 955 960

Glu Tyr Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val

965 970 975

Ser Leu Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu

980 985 990

Ile Lys Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser

995 1000 1005

Asp Tyr Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg

1010 1015 1020

Leu Asn Asn Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln

1025 1030 1035

Lys Pro Ile Ser Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile

1040 1045 1050

Met Phe Lys Leu Asp Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp

1055 1060 1065

Ile Lys Tyr Phe Asn Leu Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu

1070 1075 1080

Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys

1085 1090 1095

Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met

1100 1105 1110

Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr Val Asp Val Asn Asn Val

1115 1120 1125

Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly Pro Arg Gly Ser Val

1130	1135	1140
Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu Tyr Arg Gly Thr		
1145	1150	1155
Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys Asp Asn Ile		
1160	1165	1170
Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val Lys Asn		
1175	1180	1185
Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val Glu		
1190	1195	1200
Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser		
1205	1210	1215
Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn		
1220	1225	1230
Lys Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly		
1235	1240	1245
Phe Ile Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala		
1250	1255	1260
Ser Asn Trp Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu		
1265	1270	1275
Gly Cys Ser Trp Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu		
1280	1285	1290
Arg Pro Leu		
1295		
<210> 5		
<211> 1315		
<212> PRT		
<213> Clostridium tetani		
<400> 5		
Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn		
1	5	10
Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile		

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu

35 40 45

Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser

50 55 60

Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr

65 70 75 80

Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn

85 90 95

Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile

100 105 110

Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe

115 120 125

Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Ser Glu Gln Asp Pro

130 135 140

Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe

145 150 155 160

Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu

165 170 175

Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser

180 185 190

Ile Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Ile Pro Thr Phe Asp Asn

195 200 205

Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe

210 215 220

Gln Asp Pro Ala Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His

225 230 235 240

Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys

245 250 255

Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu

260 265 270

Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys

275 280 285

Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn

290 295 300

Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp

305 310 315 320

Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser

325 330 335

Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn

340 345 350

Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Phe Asn

355 360 365

Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys

370 375 380

Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe

385 390 395 400

Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met

405 410 415

Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val

420 425 430

Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile

435 440 445

Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Gly Gly

450 455 460

Glu Leu Cys Ile Lys Ile Lys Asn Glu Asp Leu Thr Phe Ile Ala Glu

465 470 475 480

Lys Asn Ser Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gln Asp Glu Thr Val Ser Tyr

485 490 495

Asn Thr Lys Asn Lys Pro Leu Asn Phe Asn Tyr Ser Leu Asp Lys Ile

500 505 510

Ile Leu Asp Tyr Asn Leu Gln Ser Lys Ile Thr Leu Pro Asn Asp Arg

515	520	525
Thr Thr Pro Val Thr Lys Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Lys Tyr Lys Ser		
530	535	540
Asn Ala Ala Ser Thr Ile Glu Ile His Asn Ile Asp Asp Asn Thr Ile		
545	550	555
Tyr Gln Tyr Leu Tyr Ala Gln Lys Ser Pro Thr Thr Leu Gln Arg Ile		
565	570	575
Thr Met Thr Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile		
580	585	590
Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln Gly Ala Gln		
595	600	605
Gly Ile Leu Phe Leu Gln Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr		
610	615	620
Asn Glu Ser Ser Gln Lys Thr Thr Ile Asp Lys Ile Ser Asp Val Ser		
625	630	635
640		
Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn Ile Val Lys Gln Gly		
645	650	655
Tyr Glu Gly Asn Phe Ile Gly Ala Leu Glu Thr Thr Gly Val Val Leu		
660	665	670
Leu Leu Glu Tyr Ile Pro Glu Ile Thr Leu Pro Val Ile Ala Ala Leu		
675	680	685
Ser Ile Ala Glu Ser Ser Thr Gln Lys Glu Lys Ile Ile Lys Thr Ile		
690	695	700
Asp Asn Phe Leu Glu Lys Arg Tyr Glu Lys Trp Ile Glu Val Tyr Lys		
705	710	715
720		
Leu Ile Lys Ala Lys Trp Leu Gly Thr Val Asn Thr Gln Phe Gln Lys		
725	730	735
Arg Ser Tyr Gln Met Tyr Arg Ser Leu Glu Tyr Gln Val Asp Ala Ile		
740	745	750
Lys Lys Ile Ile Asp Tyr Glu Tyr Lys Ile Tyr Ser Gly Pro Asp Lys		
755	760	765

Glu Gln Ile Ala Asp Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Lys Leu Glu Glu

770 775 780

Lys Ala Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile Asn Ile Phe Met Arg Glu Ser

785 790 795 800

Ser Arg Ser Phe Leu Val Asn Gln Met Ile Asn Glu Ala Lys Lys Gln

805 810 815

Leu Leu Glu Phe Asp Thr Gln Ser Lys Asn Ile Leu Met Gln Tyr Ile

820 825 830

Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys Lys Leu Glu

835 840 845

Ser Lys Ile Asn Lys Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser

850 855 860

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile

865 870 875 880

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile

885 890 895

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala

900 905 910

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn

915 920 925

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn

930 935 940

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys

945 950 955 960

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile

965 970 975

Ile Ser Ser Met Lys Tyr Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser

980 985 990

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala

995 1000 1005

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Ser Asp Leu Ser Asp Lys Phe

1010	1015	1020
Asn Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn		
1025	1030	1035
Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met		
1040	1045	1050
Lys Asn Ala Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn		
1055	1060	1065
Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr		
1070	1075	1080
Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro		
1085	1090	1095
Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe		
1100	1105	1110
Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr		
1115	1120	1125
Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys		
1130	1135	1140
Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr Thr		
1145	1150	1155
Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Ser Gly Leu		
1160	1165	1170
Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser		
1175	1180	1185
Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn		
1190	1195	1200
Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe		
1205	1210	1215
Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly		
1220	1225	1230
Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu		
1235	1240	1245

Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala
 1250 1255 1260
 Ser Leu Gly Leu Val Gly Ile Arg Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp
 1265 1270 1275
 Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His
 1280 1285 1290

Leu Lys Asp Lys Thr Leu Thr Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr
 1295 1300 1305
 Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp
 1310 1315

<210> 6

<211> 800

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 6

Met Thr Arg Asn Lys Phe Ile Pro Asn Lys Phe Ser Ile Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Ser Val Leu Leu Phe Ala Ile Ser Ser Ser Gln Ala Ile Glu Val Asn
 20 25 30

Ala Met Asn Glu His Tyr Thr Glu Ser Asp Ile Lys Arg Asn His Lys
 35 40 45

Thr Glu Lys Asn Lys Thr Glu Lys Glu Lys Phe Lys Asp Ser Ile Asn
 50 55 60

Asn Leu Val Lys Thr Glu Phe Thr Asn Glu Thr Leu Asp Lys Ile Gln
 65 70 75 80
 Gln Thr Gln Asp Leu Leu Lys Lys Ile Pro Lys Asp Val Leu Glu Ile
 85 90 95

Tyr Ser Glu Leu Gly Glu Ile Tyr Phe Thr Asp Ile Asp Leu Val
 100 105 110

Glu His Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ser Glu Glu Glu Lys Asn Ser Met
 115 120 125

Asn Ser Arg Gly Glu Lys Val Pro Phe Ala Ser Arg Phe Val Phe Glu

130	135	140
Lys Lys Arg Glu Thr Pro Lys Leu Ile Ile Asn Ile Lys Asp Tyr Ala		
145	150	155
Ile Asn Ser Glu Gln Ser Lys Glu Val Tyr Tyr Glu Ile Gly Lys Gly		
165	170	175
Ile Ser Leu Asp Ile Ile Ser Lys Asp Lys Ser Leu Asp Pro Glu Phe		
180	185	190
Leu Asn Leu Ile Lys Ser Leu Ser Asp Asp Ser Asp Ser Ser Asp Leu		
195	200	205
Leu Phe Ser Gln Lys Phe Lys Glu Lys Leu Glu Leu Asn Asn Lys Ser		
210	215	220
Ile Asp Ile Asn Phe Ile Lys Glu Asn Leu Thr Glu Phe Gln His Ala		
225	230	235
Phe Ser Leu Ala Phe Ser Tyr Tyr Phe Ala Pro Asp His Arg Thr Val		
245	250	255
Leu Glu Leu Tyr Ala Pro Asp Met Phe Glu Tyr Met Asn Lys Leu Glu		
260	265	270
Lys Gly Gly Phe Glu Lys Ile Ser Glu Ser Leu Lys Lys Glu Gly Val		
275	280	285
Glu Lys Asp Arg Ile Asp Val Leu Lys Gly Glu Lys Ala Leu Lys Ala		
290	295	300
Ser Gly Leu Val Pro Glu His Ala Asp Ala Phe Lys Lys Ile Ala Arg		
305	310	315
Glu Leu Asn Thr Tyr Ile Leu Phe Arg Pro Val Asn Lys Leu Ala Thr		
325	330	335
Asn Leu Ile Lys Ser Gly Val Ala Thr Lys Gly Leu Asn Val His Gly		
340	345	350
Lys Ser Ser Asp Trp Gly Pro Val Ala Gly Tyr Ile Pro Phe Asp Gln		
355	360	365
Asp Leu Ser Lys Lys His Gly Gln Gln Leu Ala Val Glu Lys Gly Asn		
370	375	380

Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Thr Glu His Glu Gly Glu Ile Gly Lys

385 390 395 400

Ile Pro Leu Lys Leu Asp His Leu Arg Ile Glu Glu Leu Lys Glu Asn

405 410 415

Gly Ile Ile Leu Lys Gly Lys Lys Glu Ile Asp Asn Gly Lys Lys Tyr

420 425 430

Tyr Leu Leu Glu Ser Asn Asn Gln Val Tyr Glu Phe Arg Ile Ser Asp

435 440 445

Glu Asn Asn Glu Val Gln Tyr Lys Thr Lys Glu Gly Lys Ile Thr Val

450 455 460

Leu Gly Glu Lys Phe Asn Trp Arg Asn Ile Glu Val Met Ala Lys Asn

465 470 475 480

Val Glu Gly Val Leu Lys Pro Leu Thr Ala Asp Tyr Asp Leu Phe Ala

485 490 495

Leu Ala Pro Ser Leu Thr Glu Ile Lys Lys Gln Ile Pro Gln Lys Glu

500 505 510

Trp Asp Lys Val Val Asn Thr Pro Asn Ser Leu Glu Lys Gln Lys Gly

515 520 525

Val Thr Asn Leu Leu Ile Lys Tyr Gly Ile Glu Arg Lys Pro Asp Ser

530 535 540

Thr Lys Gly Thr Leu Ser Asn Trp Gln Lys Gln Met Leu Asp Arg Leu

545 550 555 560

Asn Glu Ala Val Lys Tyr Thr Gly Tyr Thr Gly Gly Asp Val Val Asn

565 570 575

His Gly Thr Glu Gln Asp Asn Glu Glu Phe Pro Glu Lys Asp Asn Glu

580 585 590

Ile Phe Ile Ile Asn Pro Glu Gly Glu Phe Ile Leu Thr Lys Asn Trp

595 600 605

Glu Met Thr Gly Arg Phe Ile Glu Lys Asn Ile Thr Gly Lys Asp Tyr

610 615 620

Leu Tyr Tyr Phe Asn Arg Ser Tyr Asn Lys Ile Ala Pro Gly Asn Lys

625	630	635	640
Ala Tyr Ile Glu Trp Thr Asp Pro Ile Thr Lys Ala Lys Ile Asn Thr			
645	650	655	
Ile Pro Thr Ser Ala Glu Phe Ile Lys Asn Leu Ser Ser Ile Arg Arg			
660	665	670	
Ser Ser Asn Val Gly Val Tyr Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Glu Phe			
675	680	685	
Ala Lys Lys Glu Ser Val Lys Lys Ile Ala Gly Tyr Leu Ser Asp Tyr			
690	695	700	
Tyr Asn Ser Ala Asn His Ile Phe Ser Gln Glu Lys Lys Arg Lys Ile			
705	710	715	720
Ser Ile Phe Arg Gly Ile Gln Ala Tyr Asn Glu Ile Glu Asn Val Leu			
725	730	735	
Lys Ser Lys Gln Ile Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Tyr Phe Gln Tyr Leu			
740	745	750	
Lys Glu Arg Ile Thr Asn Gln Val Gln Leu Leu Leu Thr His Gln Lys			
755	760	765	
Ser Asn Ile Glu Phe Lys Leu Leu Tyr Lys Gln Leu Asn Phe Thr Glu			
770	775	780	
Asn Glu Thr Asp Asn Phe Glu Val Phe Gln Lys Ile Ile Asp Glu Lys			
785	790	795	800
<210> 7			
<211> 809			
<212> PRT			
<213> Bacillus anthracis			
<400> 7			
Met Asn Ile Lys Lys Glu Phe Ile Lys Val Ile Ser Met Ser Cys Leu			
1	5	10	15
Val Thr Ala Ile Thr Leu Ser Gly Pro Val Phe Ile Pro Leu Val Gln			
20	25	30	
Gly Ala Gly Gly His Gly Asp Val Gly Met His Val Lys Glu Lys Glu			
35	40	45	

Lys Asn Lys Asp Glu Asn Lys Arg Lys Asp Glu Glu Arg Asn Lys Thr

50	55	60
Gln Glu Glu His Leu Lys Glu Ile Met Lys His Ile Val Lys Ile Glu		
65	70	75
Val Lys Gly Glu Glu Ala Val Lys Lys Glu Ala Ala Glu Lys Leu Leu		
85	90	95
Glu Lys Val Pro Ser Asp Val Leu Glu Met Tyr Lys Ala Ile Gly Gly		
100	105	110
Lys Ile Tyr Ile Val Asp Gly Asp Ile Thr Lys His Ile Ser Leu Glu		
115	120	125
Ala Leu Ser Glu Asp Lys Lys Ile Lys Asp Ile Tyr Gly Lys Asp		
130	135	140
Ala Leu Leu His Glu His Tyr Val Tyr Ala Lys Glu Gly Tyr Glu Pro		
145	150	155
Val Leu Val Ile Gln Ser Ser Glu Asp Tyr Val Glu Asn Thr Glu Lys		
165	170	175
Ala Leu Asn Val Tyr Tyr Glu Ile Gly Lys Ile Leu Ser Arg Asp Ile		
180	185	190
Leu Ser Lys Ile Asn Gln Pro Tyr Gln Lys Phe Leu Asp Val Leu Asn		
195	200	205
Thr Ile Lys Asn Ala Ser Asp Ser Asp Gly Gln Asp Leu Leu Phe Thr		
210	215	220
Asn Gln Leu Lys Glu His Pro Thr Asp Phe Ser Val Glu Phe Leu Glu		
225	230	235
Gln Asn Ser Asn Glu Val Gln Glu Val Phe Ala Lys Ala Phe Ala Tyr		
245	250	255
Tyr Ile Glu Pro Gln His Arg Asp Val Leu Gln Leu Tyr Ala Pro Glu		
260	265	270
Ala Phe Asn Tyr Met Asp Lys Phe Asn Glu Gln Glu Ile Asn Leu Ser		
275	280	285
Leu Glu Glu Leu Lys Asp Gln Arg Met Leu Ser Arg Tyr Glu Lys Trp		

290	295	300
Glu Lys Ile Lys Gln His Tyr Gln His Trp Ser Asp Ser Leu Ser Glu		
305	310	315
Glu Gly Arg Gly Leu Leu Lys Leu Gln Ile Pro Ile Glu Pro Lys		
325	330	335
Lys Asp Asp Ile Ile His Ser Leu Ser Gln Glu Glu Lys Glu Leu Leu		
340	345	350
Lys Arg Ile Gln Ile Asp Ser Ser Asp Phe Leu Ser Thr Glu Glu Lys		
355	360	365
Glu Phe Leu Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ile Arg Asp Ser Leu Ser Glu		
370	375	380
Glu Glu Lys Glu Leu Leu Asn Arg Ile Gln Val Asp Ser Ser Asn Pro		
385	390	395
Leu Ser Glu Lys Glu Lys Glu Phe Leu Lys Lys Leu Lys Leu Asp Ile		
405	410	415
Gln Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Arg Leu Gln Asp Thr Gly Leu Ile		
420	425	430
Asp Ser Pro Ser Ile Asn Leu Asp Val Arg Lys Gln Tyr Lys Arg Asp		
435	440	445
Ile Gln Asn Ile Asp Ala Leu Leu His Gln Ser Ile Gly Ser Thr Leu		
450	455	460
Tyr Asn Lys Ile Tyr Leu Tyr Glu Asn Met Asn Ile Asn Asn Leu Thr		
465	470	475
480		
Ala Thr Leu Gly Ala Asp Leu Val Asp Ser Thr Asp Asn Thr Lys Ile		
485	490	495
Asn Arg Gly Ile Phe Asn Glu Phe Lys Lys Asn Phe Lys Tyr Ser Ile		
500	505	510
Ser Ser Asn Tyr Met Ile Val Asp Ile Asn Glu Arg Pro Ala Leu Asp		
515	520	525
Asn Glu Arg Leu Lys Trp Arg Ile Gln Leu Ser Pro Asp Thr Arg Ala		
530	535	540

Gly Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Leu Ile Leu Gln Arg Asn Ile Gly Leu
 545 550 555 560
 Glu Ile Lys Asp Val Gln Ile Ile Lys Gln Ser Glu Lys Glu Tyr Ile
 565 570 575
 Arg Ile Asp Ala Lys Val Val Pro Lys Ser Lys Ile Asp Thr Lys Ile
 580 585 590
 Gln Glu Ala Gln Leu Asn Ile Asn Gln Glu Trp Asn Lys Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Pro Lys Tyr Thr Lys Leu Ile Thr Phe Asn Val His Asn Arg Tyr
 610 615 620
 Ala Ser Asn Ile Val Glu Ser Ala Tyr Leu Ile Leu Asn Glu Trp Lys
 625 630 635 640
 Asn Asn Ile Gln Ser Asp Leu Ile Lys Lys Val Thr Asn Tyr Leu Val
 645 650 655
 Asp Gly Asn Gly Arg Phe Val Phe Thr Asp Ile Thr Leu Pro Asn Ile
 660 665 670
 Ala Glu Gln Tyr Thr His Gln Asp Glu Ile Tyr Glu Gln Val His Ser
 675 680 685
 Lys Gly Leu Tyr Val Pro Glu Ser Arg Ser Ile Leu Leu His Gly Pro
 690 695 700
 Ser Lys Gly Val Glu Leu Arg Asn Asp Ser Glu Gly Phe Ile His Glu
 705 710 715 720
 Phe Gly His Ala Val Asp Asp Tyr Ala Gly Tyr Leu Leu Asp Lys Asn
 725 730 735
 Gln Ser Asp Leu Val Thr Asn Ser Lys Lys Phe Ile Asp Ile Phe Lys
 740 745 750
 Glu Glu Gly Ser Asn Leu Thr Ser Tyr Gly Arg Thr Asn Glu Ala Glu
 755 760 765
 Phe Phe Ala Glu Ala Phe Arg Leu Met His Ser Thr Asp His Ala Glu
 770 775 780
 Arg Leu Lys Val Gln Lys Asn Ala Pro Lys Thr Phe Gln Phe Ile Asn

785 790 795 800

Asp Gln Ile Lys Phe Ile Ile Asn Ser

805

<210> 8

<211> 71

<212> PRT

<213> Conus magus

<400> 8

Met Lys Leu Thr Cys Val Val Ile Val Ala Val Leu Leu Thr Ala

1 5 10 15

Cys Gln Leu Ile Thr Ala Asp Asp Ser Arg Gly Thr Gln Lys His Arg

20 25 30

Ala Leu Arg Ser Thr Thr Lys Leu Ser Met Ser Thr Arg Cys Lys Gly

35 40 45

Lys Gly Ala Lys Cys Ser Arg Leu Met Tyr Asp Cys Cys Thr Gly Ser

50 55 60

Cys Arg Ser Gly Lys Cys Gly

65 70

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Conus geographus

<400> 9

Ala Cys Ser Gly Arg Gly Ser Arg Cys Pro Pro Gln Cys Cys Met Gly

1 5 10 15

Leu Arg Cys Gly Arg Gly Asn Pro Gln Lys Cys Ile Gly Ala His Glu

20 25 30

Asp Val

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

<213> Conus eburneus

<400> 10

Leu Asn Lys Arg Cys Ala Gly Ile Gly Ser Phe Cys Gly Leu Pro Gly

1 5 10 15

Leu Val Asp Cys Cys Ser Gly Arg Cys Phe Ile Val Cys Leu Pro

20 25 30

<210> 11

<211> 293

<212> PRT

<213> Shigella dysenteriae

<400> 11

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165	170	175	
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met			
180	185	190	
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser			
195	200	205	
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile			
210	215	220	
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu			
225	230	235	240
Asn Cys His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu			
245	250	255	
Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His			
260	265	270	
Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg			
275	280	285	
Arg Thr Ile Ser Ser			
290			
<210			
> 12			
<211> 69			
<212> PRT			
<213> Shigella dysenteriae			
<400> 12			
Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys Tyr Asn Asp			
1	5	10	15
Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Thr Asn			
20	25	30	
Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Ser Ala Gln Ile Thr Gly Met			
35	40	45	
Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly Phe Ser			
50	55	60	
Glu Val Ile Phe Arg			
65			

<210> 13

<211> 613

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 13

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val

1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro

20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val

35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu

50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu

65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser

85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn

100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His

115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys

130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu

145 150 155 160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met

165 170 175

Ala Gln Ala Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser

180 185 190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr

195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile

210	215	220	
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys			
225	230	235	240
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu			
245	250	255	
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe			
260	265	270	
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly			
275	280	285	
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser			
290	295	300	
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly			
305	310	315	320
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala			
325	330	335	
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg			
340	345	350	
Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val			
355	360	365	
Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp			
370	375	380	
Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe			
385	390	395	400
Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn			
405	410	415	
Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg			
420	425	430	
Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln			
435	440	445	
Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala			
450	455	460	

Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480
 Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495
 Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510
 Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525
 Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540
 Pro Glu Glu Glu Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560
 Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575
 Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590
 Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605
 Arg Glu Asp Leu Lys
 610
 <210
 > 14
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Vibrio cholerae
 <400> 14
 Asn Asp Asp Lys Leu Tyr Arg Ala Asp Ser Arg Pro Pro Asp Glu Ile
 1 5 10 15
 Lys Gln Ser Gly Gly Leu Met Pro Arg Gly Gln Ser Glu Tyr Phe Asp
 20 25 30
 Arg Gly Thr Gln Met Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg Gly Thr
 35 40 45

Gln Thr Gly Phe Val Arg His Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ser Ile

50	55	60
Ser Leu Arg Ser Ala His Leu Val Gly Gln Thr Ile Leu Ser Gly His		
65	70	75
Ser Thr Tyr Tyr Leu Tyr Val Leu Ala Thr Ala Pro Asn Met Phe Asn		
85	90	95
Val Asn Asp Val Leu Gly Ala Tyr Ser Pro His Pro Asp Glu Gln Glu		
100	105	110
Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly Trp Tyr		
115	120	125
Arg Val His Phe Gly Val Leu Asp Glu Gln Leu His Arg Asn Arg Gly		
130	135	140
Tyr Arg Asp Arg Tyr Tyr Ser Asn Leu Asp Ile Ala Pro Ala Ala Asp		
145	150	155
160		
Gly Tyr Gly Leu Ala Gly Phe Pro Pro Glu His Arg Ala Trp Arg Glu		
165	170	175
Glu Pro Trp Ile His His Ala Pro Pro Gly Cys Gly Asn Ala Pro Arg		
180	185	190
Ser Ser		

<210> 15

<211> 46

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 15

Met Ser Asn Thr Cys Asp Glu Lys Thr Gln Ser Leu Gly Val Lys Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Asp Glu Tyr Gln Ser Lys Val Lys Arg Gln Ile Phe Ser Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

Gln Ser Asp Ile Asp Thr His Asn Arg Ile Lys Asp Glu Leu

35	40	45
----	----	----

<210> 16

<211> 103

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400> 16

Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Ile Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala

20 25 30

Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala Ile Phe

35 40 45

Gln Val Glu Val Pro Ser Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala

50 55 60

Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala

65 70 75 80

Lys Val Glu Lys Leu Cys Thr Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile

85 90 95

Ala Ala Ile Ser Met Ala Asn

100

<210> 17

<211> 456

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 17

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asn

1 5 10 15

Asp Thr Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Tyr Cys Lys Gly Leu Asp Ile

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu

35 40 45

Arg Tyr Glu Phe Gly Thr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Pro Pro Ser Ser

50 55 60

Leu Ile Glu Gly Ala Ser Glu Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr

65 70 75 80

Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn

85 90 95

Arg Ile Lys Asn Asn Val Ala Gly Glu Ala Leu Leu Asp Lys Ile Ile

100 105 110

Asn Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Phe

115 120 125

Asp Thr Asn Ser Asn Ser Val Ser Phe Asn Leu Leu Glu Gln Asp Pro

130 135 140

Ser Gly Ala Thr Thr Lys Ser Ala Met Leu Thr Asn Leu Ile Ile Phe

145 150 155 160

Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Lys Asn Glu Val Arg Gly Ile Val Leu

165 170 175

Arg Val Asp Asn Lys Asn Tyr Phe Pro Cys Arg Asp Gly Phe Gly Ser

180 185 190

Ile Met Gln Met Ala Phe Cys Pro Glu Tyr Val Pro Thr Phe Asp Asn

195 200 205

Val Ile Glu Asn Ile Thr Ser Leu Thr Ile Gly Lys Ser Lys Tyr Phe

210 215 220

Gln Asp Pro Ala Leu Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His

225 230 235 240

Gly Leu Tyr Gly Met Gln Val Ser Ser His Glu Ile Ile Pro Ser Lys

245 250 255

Gln Glu Ile Tyr Met Gln His Thr Tyr Pro Ile Ser Ala Glu Glu Leu

260 265 270

Phe Thr Phe Gly Gly Gln Asp Ala Asn Leu Ile Ser Ile Asp Ile Lys

275 280 285

Asn Asp Leu Tyr Glu Lys Thr Leu Asn Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Asn

290 295 300

Lys Leu Ser Gln Val Thr Ser Cys Asn Asp Pro Asn Ile Asp Ile Asp

305 310 315 320

Ser Tyr Lys Gln Ile Tyr Gln Gln Lys Tyr Gln Phe Asp Lys Asp Ser

325 330 335

Asn Gly Gln Tyr Ile Val Asn Glu Asp Lys Phe Gln Ile Leu Tyr Asn

340 345 350

Ser Ile Met Tyr Gly Phe Thr Glu Ile Glu Leu Gly Lys Lys Phe Asn

355 360 365

Ile Lys Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Ser Met Asn His Asp Pro Val Lys

370 375 380

Ile Pro Asn Leu Leu Asp Asp Thr Ile Tyr Asn Asp Thr Glu Gly Phe

385 390 395 400

Asn Ile Glu Ser Lys Asp Leu Lys Ser Glu Tyr Lys Gly Gln Asn Met

405 410 415

Arg Val Asn Thr Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Gly Ser Gly Leu Val

420 425 430

Ser Lys Leu Ile Gly Leu Cys Lys Lys Ile Ile Pro Pro Thr Asn Ile

435 440 445

Arg Glu Asn Leu Tyr Asn Arg Thr

450 455

<210> 18

<211> 267

<212> PRT

<213> Ricinus communis

<400> 18

Ile Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Ile Ile Asn Phe Thr Thr Ala Gly Ala

1 5 10 15

Thr Val Gln Ser Tyr Thr Asn Phe Ile Arg Ala Val Arg Gly Arg Leu

20 25 30

Thr Thr Gly Ala Asp Val Arg His Glu Ile Pro Val Leu Pro Asn Arg

35 40 45

Val Gly Leu Pro Ile Asn Gln Arg Phe Ile Leu Val Glu Leu Ser Asn

50	55	60
His Ala Glu Leu Ser Val Thr Leu Ala Leu Asp Val Thr Asn Ala Tyr		
65	70	75
Val Val Gly Tyr Arg Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Phe Phe His Pro Asp		
85	90	95
Asn Gln Glu Asp Ala Glu Ala Ile Thr His Leu Phe Thr Asp Val Gln		
100	105	110
Asn Arg Tyr Thr Phe Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Asp Arg Leu Glu Gln		
115	120	125
Leu Ala Gly Asn Leu Arg Glu Asn Ile Glu Leu Gly Asn Gly Pro Leu		
130	135	140
Glu Glu Ala Ile Ser Ala Leu Tyr Tyr Ser Thr Gly Gly Thr Gln		
145	150	155
Leu Pro Thr Leu Ala Arg Ser Phe Ile Ile Cys Ile Gln Met Ile Ser		
165	170	175
Glu Ala Ala Arg Phe Gln Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg Thr Arg Ile		
180	185	190
Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Ala Pro Asp Pro Ser Val Ile Thr Leu Glu		
195	200	205
Asn Ser Trp Gly Arg Leu Ser Thr Ala Ile Gln Glu Ser Asn Gln Gly		
210	215	220
Ala Phe Ala Ser Pro Ile Gln Leu Gln Arg Arg Asn Gly Ser Lys Phe		
225	230	235
Ser Val Tyr Asp Val Ser Ile Leu Ile Pro Ile Ile Ala Leu Met Val		
245	250	255
Tyr Arg Cys Ala Pro Pro Ser Ser Gln Phe		
260	265	
<210> 19		
<211> 262		
<212> PRT		
<213> Ricinus communis		
<400> 19		

Ala Asp Val Cys Met Asp Pro Glu Pro Ile Val Arg Ile Val Gly Arg

1 5 10 15

Asn Gly Leu Cys Val Asp Val Arg Asp Gly Arg Phe His Asn Gly Asn

20 25 30

Ala Ile Gln Leu Trp Pro Cys Lys Ser Asn Thr Asp Ala Asn Gln Leu

35 40 45

Trp Thr Leu Lys Arg Asp Asn Thr Ile Arg Ser Asn Gly Lys Cys Leu

50 55 60

Thr Thr Tyr Gly Tyr Ser Pro Gly Val Tyr Val Met Ile Tyr Asp Cys

65 70 75 80

Asn Thr Ala Ala Thr Asp Ala Thr Arg Trp Gln Ile Trp Asp Asn Gly

85 90 95

Thr Ile Ile Asn Pro Arg Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala Thr Ser Gly

100 105 110

Asn Ser Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Asn Ile Tyr Ala Val Ser

115 120 125

Gln Gly Trp Leu Pro Thr Asn Asn Thr Gln Pro Phe Val Thr Thr Ile

130 135 140

Val Gly Leu Tyr Gly Leu Cys Leu Gln Ala Asn Ser Gly Gln Val Trp

145 150 155 160

Ile Glu Asp Cys Ser Ser Glu Lys Ala Glu Gln Gln Trp Ala Leu Tyr

165 170 175

Ala Asp Gly Ser Ile Arg Pro Gln Gln Asn Arg Asp Asn Cys Leu Thr

180 185 190

Ser Asp Ser Asn Ile Arg Glu Thr Val Val Lys Ile Leu Ser Cys Gly

195 200 205

Pro Ala Ser Ser Gly Gln Arg Trp Met Phe Lys Asn Asp Gly Thr Ile

210 215 220

Leu Asn Leu Tyr Ser Gly Leu Val Leu Asp Val Arg Ala Ser Asp Pro

225 230 235 240

Ser Leu Lys Gln Ile Ile Leu Tyr Pro Leu His Gly Asp Pro Asn Gln

245	250	255
Ile Trp Leu Pro Leu Phe		
260		
<210> 20		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> Clostridium botulinum		
<400> 20		
Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly		
1	5	10
Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro		
20 25 30		
Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg		
35	40	45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu		
50	55	60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr		
65	70	75
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu		
85 90 95		
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val		
100	105	110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys		
115	120	125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr		
130	135	140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile		
145 150 155 160		
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr		
165	170	175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe		
180	185	190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435

440

445

<210> 21

<211> 430

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 21

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1

5

10

15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro

20

25

30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35

40

45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50

55

60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65

70

75

80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85

90

95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100

105

110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115

120

125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130

135

140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145

150

155

160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165

170

175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe

180

185

190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys

420 425 430

<210> 22

<211> 441

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 22

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn

1 5 10 15

Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu

35 40 45

Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly

50 55 60

Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn

65 70 75 80

Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe

85 90 95

Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile

100 105 110

Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu

115 120 125

Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn

130 135 140

Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile

145 150 155 160

Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly

165 170 175

Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln

180 185 190

Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu

195 200 205

Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro

210 215 220

Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn
 290 295 300
 Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr
 305 310 315 320
 Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly
 325 330 335
 Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu
 340 345 350
 Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys
 355 360 365
 Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys
 370 375 380
 Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile
 405 410 415
 Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys
 435 440
 <210> 23
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Clostridium botulinum

<400> 23

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg
 20 25 30
 Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly
 50 55 60
 Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn
 65 70 75 80
 Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95
 Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile
 100 105 110
 Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu
 115 120 125
 Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn
 130 135 140
 Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160
 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly
 165 170 175
 Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln
 180 185 190
 Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro
 210 215 220
 Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe

245 250 255

Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe

260 265 270

Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile

275 280 285

Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn

290 295 300

Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr

305 310 315 320

Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly

325 330 335

Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu

340 345 350

Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys

355 360 365

Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys

370 375 380

Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile

385 390 395 400

Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile

405 410 415

Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr

420 425 430

Lys Ile Gln Met Cys

435

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 24

Met Pro Ile Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asp Asn

1	5	10	15
Lys Asn Ile Leu Tyr Leu Asp Thr His Leu Asn Thr Leu Ala Asn Glu			
20	25	30	
Pro Glu Lys Ala Phe Arg Ile Thr Gly Asn Ile Trp Val Ile Pro Asp			
35	40	45	
Arg Phe Ser Arg Asn Ser Asn Pro Asn Leu Asn Lys Pro Pro Arg Val			
50	55	60	
Thr Ser Pro Lys Ser Gly Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Ser Thr Asp			
65	70	75	80
Ser Asp Lys Asp Pro Phe Leu Lys Glu Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg			
85	90	95	
Ile Asn Ser Arg Glu Ile Gly Glu Glu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Thr			
100	105	110	
Asp Ile Pro Phe Pro Gly Asn Asn Asn Thr Pro Ile Asn Thr Phe Asp			
115	120	125	
Phe Asp Val Asp Phe Asn Ser Val Asp Val Lys Thr Arg Gln Gly Asn			
130	135	140	
Asn Trp Val Lys Thr Gly Ser Ile Asn Pro Ser Val Ile Ile Thr Gly			
145	150	155	160
Pro Arg Glu Asn Ile Ile Asp Pro Glu Thr Ser Thr Phe Lys Leu Thr			
165	170	175	
Asn Asn Thr Phe Ala Ala Gln Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ser Ile Ile			
180	185	190	
Ser Ile Ser Pro Arg Phe Met Leu Thr Tyr Ser Asn Ala Thr Asn Asp			
195	200	205	
Val Gly Glu Gly Arg Phe Ser Lys Ser Glu Phe Cys Met Asp Pro Ile			
210	215	220	
Leu Ile Leu Met His Glu Leu Asn His Ala Met His Asn Leu Tyr Gly			
225	230	235	240
Ile Ala Ile Pro Asn Asp Gln Thr Ile Ser Ser Val Thr Ser Asn Ile			
245	250	255	

Phe Tyr Ser Gln Tyr Asn Val Lys Leu Glu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala

260 265 270

Phe Gly Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ala Arg Lys Tyr

275 280 285

Phe Glu Glu Lys Ala Leu Asp Tyr Tyr Arg Ser Ile Ala Lys Arg Leu

290 295 300

Asn Ser Ile Thr Thr Ala Asn Pro Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ile Gly

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Gln Lys Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Phe Val Val Glu Ser

325 330 335

Ser Gly Glu Val Thr Val Asn Arg Asn Lys Phe Val Glu Leu Tyr Asn

340 345 350

Glu Leu Thr Gln Ile Phe Thr Glu Phe Asn Tyr Ala Lys Ile Tyr Asn

355 360 365

Val Gln Asn Arg Lys Ile Tyr Leu Ser Asn Val Tyr Thr Pro Val Thr

370 375 380

Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Val Tyr Asp Ile Gln Asn Gly Phe Asn

385 390 395 400

Ile Pro Lys Ser Asn Leu Asn Val Leu Phe Met Gly Gln Asn Leu Ser

405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Arg Lys Val Asn Pro Glu Asn Met Leu Tyr Leu

420 425 430

Phe Thr Lys Phe Cys His Lys Ala Ile Asp Gly Arg Ser Leu Tyr Asn

435 440 445

Lys

<210> 25

<211> 442

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 25

Met Thr Trp Pro Val Lys Asp Phe Asn Tyr Ser Asp Pro Val Asn Asp

1	5	10	15
Asn Asp Ile Leu Tyr Leu Arg Ile Pro Gln Asn Lys Leu Ile Thr Thr			
20	25	30	
Pro Val Lys Ala Phe Met Ile Thr Gln Asn Ile Trp Val Ile Pro Glu			
35	40	45	
Arg Phe Ser Ser Asp Thr Asn Pro Ser Leu Ser Lys Pro Pro Arg Pro			
50	55	60	
Thr Ser Lys Tyr Gln Ser Tyr Tyr Asp Pro Ser Tyr Leu Ser Thr Asp			
65	70	75	80
Glu Gln Lys Asp Thr Phe Leu Lys Gly Ile Ile Lys Leu Phe Lys Arg			
85	90	95	
Ile Asn Glu Arg Asp Ile Gly Lys Lys Leu Ile Asn Tyr Leu Val Val			
100	105	110	
Gly Ser Pro Phe Met Gly Asp Ser Ser Thr Pro Glu Asp Thr Phe Asp			
115	120	125	
Phe Thr Arg His Thr Thr Asn Ile Ala Val Glu Lys Phe Glu Asn Gly			
130	135	140	
Ser Trp Lys Val Thr Asn Ile Ile Thr Pro Ser Val Leu Ile Phe Gly			
145	150	155	160
Pro Leu Pro Asn Ile Leu Asp Tyr Thr Ala Ser Leu Thr Leu Gln Gly			
165	170	175	
Gln Gln Ser Asn Pro Ser Phe Glu Gly Phe Gly Thr Leu Ser Ile Leu			
180	185	190	
Lys Val Ala Pro Glu Phe Leu Leu Thr Phe Ser Asp Val Thr Ser Asn			
195	200	205	
Gln Ser Ser Ala Val Leu Gly Lys Ser Ile Phe Cys Met Asp Pro Val			
210	215	220	
Ile Ala Leu Met His Glu Leu Thr His Ser Leu His Gln Leu Tyr Gly			
225	230	235	240
Ile Asn Ile Pro Ser Asp Lys Arg Ile Arg Pro Gln Val Ser Glu Gly			
245	250	255	

Phe Phe Ser Gln Asp Gly Pro Asn Val Gln Phe Glu Glu Leu Tyr Thr

260 265 270

Phe Gly Gly Leu Asp Val Glu Ile Ile Pro Gln Ile Glu Arg Ser Gln

275 280 285

Leu Arg Glu Lys Ala Leu Gly His Tyr Lys Asp Ile Ala Lys Arg Leu

290 295 300

Asn Asn Ile Asn Lys Thr Ile Pro Ser Ser Trp Ile Ser Asn Ile Asp

305 310 315 320

Lys Tyr Lys Lys Ile Phe Ser Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Asn

325 330 335

Thr Gly Asn Phe Val Val Asn Ile Asp Lys Phe Asn Ser Leu Tyr Ser

340 345 350

Asp Leu Thr Asn Val Met Ser Glu Val Val Tyr Ser Ser Gln Tyr Asn

355 360 365

Val Lys Asn Arg Thr His Tyr Phe Ser Arg His Tyr Leu Pro Val Phe

370 375 380

Ala Asn Ile Leu Asp Asp Asn Ile Tyr Thr Ile Arg Asp Gly Phe Asn

385 390 395 400

Leu Thr Asn Lys Gly Phe Asn Ile Glu Asn Ser Gly Gln Asn Ile Glu

405 410 415

Arg Asn Pro Ala Leu Gln Lys Leu Ser Ser Glu Ser Val Val Asp Leu

420 425 430

Phe Thr Lys Val Cys Leu Arg Leu Thr Lys

435 440

<210> 26

<211> 422

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 26

Met Pro Thr Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asn Arg

1 5 10 15

Thr Ile Leu Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Cys Gln Gln Phe Tyr Lys Ser

20 25 30

Phe Asn Ile Met Lys Asn Ile Trp Ile Ile Pro Glu Arg Asn Val Ile

35 40 45

Gly Thr Ile Pro Gln Asp Phe Leu Pro Pro Thr Ser Leu Lys Asn Gly

50 55 60

Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Lys

65 70 75 80

Asp Lys Phe Leu Lys Ile Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg Ile Asn Asp

85 90 95

Asn Leu Ser Gly Arg Ile Leu Leu Glu Glu Leu Ser Lys Ala Asn Pro

100 105 110

Tyr Leu Gly Asn Asp Asn Thr Pro Asp Gly Asp Phe Ile Ile Asn Asp

115 120 125

Ala Ser Ala Val Pro Ile Gln Phe Ser Asn Gly Ser Gln Ser Ile Leu

130 135 140

Leu Pro Asn Val Ile Ile Met Gly Ala Glu Pro Asp Leu Phe Glu Thr

145 150 155 160

Asn Ser Ser Asn Ile Ser Leu Arg Asn Asn Tyr Met Pro Ser Asn His

165 170 175

Gly Phe Gly Ser Ile Ala Ile Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Ser Phe

180 185 190

Arg Phe Lys Asp Asn Ser Met Asn Glu Phe Ile Gln Asp Pro Ala Leu

195 200 205

Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Ser Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala

210 215 220

Lys Gly Ile Thr Thr Lys Tyr Thr Ile Thr Gln Lys Gln Asn Pro Leu

225 230 235 240

Ile Thr Asn Ile Arg Gly Thr Asn Ile Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly

245 250 255

Gly Thr Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Gln Ser Asn Asp Ile Tyr

260	265	270
Thr Asn Leu Leu Ala Asp Tyr Lys Lys Ile Ala Ser Lys Leu Ser Lys		
275	280	285
Val Gln Val Ser Asn Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Lys Asp Val Phe Glu		
290	295	300
Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asp Ala Ser Gly Ile Tyr Ser Val Asn		
305	310	315
Ile Asn Lys Phe Asn Asp Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr Glu		
325	330	335
Phe Asp Leu Ala Thr Lys Phe Gln Val Lys Cys Arg Gln Thr Tyr Ile		
340	345	350
Gly Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Leu Leu Asn Asp Ser Ile		
355	360	365
Tyr Asn Ile Ser Glu Gly Tyr Asn Ile Asn Asn Leu Lys Val Asn Phe		
370	375	380
Arg Gly Gln Asn Ala Asn Leu Asn Pro Arg Ile Ile Thr Pro Ile Thr		
385	390	395
400		
Gly Arg Gly Leu Val Lys Lys Ile Ile Arg Phe Cys Lys Asn Ile Val		
405	410	415
Ser Val Lys Gly Ile Arg		
420		
<210> 27		
<211> 436		
<212> PRT		
<213> Clostridium botulinum		
<400> 27		
Met Pro Val Ala Ile Asn Ser Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Val Asn Asp		
1	5	10
Asp Thr Ile Leu Tyr Met Gln Ile Pro Tyr Glu Glu Lys Ser Lys Lys		
20	25	30
Tyr Tyr Lys Ala Phe Glu Ile Met Arg Asn Val Trp Ile Ile Pro Glu		

35 40 45

Arg Asn Thr Ile Gly Thr Asn Pro Ser Asp Phe Asp Pro Pro Ala Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Thr Thr

65 70 75 80

Asp Ala Glu Lys Asp Arg Tyr Leu Lys Thr Thr Ile Lys Leu Phe Lys

85 90 95

Arg Ile Asn Ser Asn Pro Ala Gly Lys Val Leu Leu Gln Glu Ile Ser

100 105 110

Tyr Ala Lys Pro Tyr Leu Gly Asn Asp His Thr Pro Ile Asp Glu Phe

115 120 125

Ser Pro Val Thr Arg Thr Thr Ser Val Asn Ile Lys Leu Ser Thr Asn

130 135 140

Val Glu Ser Ser Met Leu Leu Asn Leu Leu Val Leu Gly Ala Gly Pro

145 150 155 160

Asp Ile Phe Glu Ser Cys Cys Tyr Pro Val Arg Lys Leu Ile Asp Pro

165 170 175

Asp Val Val Tyr Asp Pro Ser Asn Tyr Gly Phe Gly Ser Ile Asn Ile

180 185 190

Val Thr Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Tyr Thr Phe Asn Asp Ile Ser Gly

195 200 205

Gly His Asn Ser Ser Thr Glu Ser Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ile Ser

210 215 220

Leu Ala His Glu Leu Ile His Ala Leu His Gly Leu Tyr Gly Ala Arg

225 230 235 240

Gly Val Thr Tyr Glu Glu Thr Ile Glu Val Lys Gln Ala Pro Leu Met

245 250 255

Ile Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Glu Glu Phe Leu Thr Phe Gly Gly

260 265 270

Gln Asp Leu Asn Ile Ile Thr Ser Ala Met Lys Glu Lys Ile Tyr Asn

275 280 285

Asn Leu Leu Ala Asn Tyr Glu Lys Ile Ala Thr Arg Leu Ser Glu Val

290 295 300

Asn Ser Ala Pro Pro Glu Tyr Asp Ile Asn Glu Tyr Lys Asp Tyr Phe

305 310 315 320

Gln Trp Lys Tyr Gly Leu Asp Lys Asn Ala Asp Gly Ser Tyr Thr Val

325 330 335

Asn Glu Asn Lys Phe Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr Ser Phe Thr

340 345 350

Glu Ser Asp Leu Ala Asn Lys Phe Lys Val Lys Cys Arg Asn Thr Tyr

355 360 365

Phe Ile Lys Tyr Glu Phe Leu Lys Val Pro Asn Leu Leu Asp Asp Asp

370 375 380

Ile Tyr Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Ile Gly Asn Leu Ala Val Asn

385 390 395 400

Asn Arg Gly Gln Ser Ile Lys Leu Asn Pro Lys Ile Ile Asp Ser Ile

405 410 415

Pro Asp Lys Gly Leu Val Glu Lys Ile Val Lys Phe Cys Lys Ser Val

420 425 430

Ile Pro Arg Lys

435

<210> 28

<211> 442

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Any amino acid

<400> 28

Met Pro Val Asn Ile Lys Xaa Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asn Asn

1 5 10 15

Asp Asp Ile Ile Met Met Glu Pro Phe Asn Asp Pro Gly Pro Gly Thr

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Arg Ile Ile Asp Arg Ile Trp Ile Val Pro Glu
 35 40 45
 Arg Phe Thr Tyr Gly Phe Gln Pro Asp Gln Phe Asn Ala Ser Thr Gly
 50 55 60
 Val Phe Ser Lys Asp Val Tyr Glu Tyr Tyr Asp Pro Thr Tyr Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Asp Ala Glu Lys Asp Lys Phe Leu Lys Thr Met Ile Lys Leu Phe
 85 90 95

 Asn Arg Ile Asn Ser Lys Pro Ser Gly Gln Arg Leu Leu Asp Met Ile
 100 105 110
 Val Asp Ala Ile Pro Tyr Leu Gly Asn Ala Ser Thr Pro Pro Asp Lys
 115 120 125
 Phe Ala Ala Asn Val Ala Asn Val Ser Ile Asn Lys Lys Ile Ile Gln
 130 135 140
 Pro Gly Ala Glu Asp Gln Ile Lys Gly Leu Met Thr Asn Leu Ile Ile
 145 150 155 160

 Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Ser Asp Asn Phe Thr Asp Ser Met Ile
 165 170 175
 Met Asn Gly His Ser Pro Ile Ser Glu Gly Phe Gly Ala Arg Met Met
 180 185 190
 Ile Arg Phe Cys Pro Ser Cys Leu Asn Val Phe Asn Asn Val Gln Glu
 195 200 205
 Asn Lys Asp Thr Ser Ile Phe Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Ala Asp Pro
 210 215 220

 Ala Leu Thr Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Ile Lys Ile Ser Asn Leu Pro Ile Thr Pro Asn Thr Lys Glu Phe
 245 250 255
 Phe Met Gln His Ser Asp Pro Val Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe
 260 265 270
 Gly Gly His Asp Pro Ser Val Ile Ser Pro Ser Thr Asp Met Asn Ile

275

280

285

Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Asn Phe Gln Asp Ile Ala Asn Arg Leu Asn

290

295

300

Ile Val Ser Ser Ala Gln Gly Ser Gly Ile Asp Ile Ser Leu Tyr Lys

305 310 315 320

Gln Ile Tyr Lys Asn Lys Tyr Asp Phe Val Glu Asp Pro Asn Gly Lys

325

330

335

Tyr Ser Val Asp Lys Asp Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ala Leu Met

340

345

350

Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Leu Ala Gly Glu Tyr Gly Ile Lys Thr

355

360

365

Arg Tyr Ser Tyr Phe Ser Glu Tyr Leu Pro Pro Ile Lys Thr Glu Lys

370

375

380

Leu Leu Asp Asn Thr Ile Tyr Thr Gln Asn Glu Gly Phe Asn Ile Ala

385 390 395 400

Ser Lys Asn Leu Lys Thr Glu Phe Asn Gly Gln Asn Lys Ala Val Asn

405

410

415

Lys Glu Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Leu Glu His Leu Val Ile Tyr Arg

420

425

430

Ile Ala Met Cys Lys Pro Val Met Tyr Lys

435

440

<210> 29

<211> 872

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 29

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro

20

25

30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35	40	45
Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu		
50	55	60
Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr		
65	70	75
Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu		
85	90	95
Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val		
100	105	110
Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys		
115	120	125
Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr		
130	135	140
Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile		
145	150	155
Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr		
165	170	175
Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe		
180	185	190
Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu		
195	200	205
Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu		
210	215	220
Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn		
225	230	235
Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu		
245	250	255
Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys		
260	265	270
Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn		
275	280	285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu

485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asn Glu Pro

500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu

515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Lys Tyr Glu

530	535	540
Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu		
545	550	555
His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu		
565	570	575
Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys		
580	585	590
Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu		
595	600	605
Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr		
610	615	620
Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala		
625	630	635
Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu		
645	650	655
Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala		
660	665	670
Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys		
675	680	685
Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu		
690	695	700
Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys		
705	710	715
Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu		
725	730	735
Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn		
740	745	750
Gln Tyr Thr Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp		
755	760	765
Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile		
770	775	780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met
 785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys
 805 810 815
 Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly
 820 825 830
 Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn Asn Thr Leu Ser Thr Asp
 835 840 845
 Ile Pro Phe Gln Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser
 850 855 860

Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Lys Asn

865 870

<210> 30

<211> 842

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 30

Met Pro Phe Val Asn Lys Gln Phe Asn Tyr Lys Asp Pro Val Asn Gly

1 5 10 15

Val Asp Ile Ala Tyr Ile Lys Ile Pro Asn Val Gly Gln Met Gln Pro

20 25 30

Val Lys Ala Phe Lys Ile His Asn Lys Ile Trp Val Ile Pro Glu Arg

35 40 45

Asp Thr Phe Thr Asn Pro Glu Glu Gly Asp Leu Asn Pro Pro Pro Glu

50 55 60

Ala Lys Gln Val Pro Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Leu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Glu Lys Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Val Thr Lys Leu Phe Glu

85 90 95

Arg Ile Tyr Ser Thr Asp Leu Gly Arg Met Leu Leu Thr Ser Ile Val

100 105 110

Arg Gly Ile Pro Phe Trp Gly Gly Ser Thr Ile Asp Thr Glu Leu Lys

115 120 125

Val Ile Asp Thr Asn Cys Ile Asn Val Ile Gln Pro Asp Gly Ser Tyr

130 135 140

Arg Ser Glu Glu Leu Asn Leu Val Ile Ile Gly Pro Ser Ala Asp Ile

145 150 155 160

Ile Gln Phe Glu Cys Lys Ser Phe Gly His Glu Val Leu Asn Leu Thr

165 170 175

Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Tyr Ile Arg Phe Ser Pro Asp Phe

180 185 190

Thr Phe Gly Phe Glu Glu Ser Leu Glu Val Asp Thr Asn Pro Leu Leu

195 200 205

Gly Ala Gly Lys Phe Ala Thr Asp Pro Ala Val Thr Leu Ala His Glu

210 215 220

Leu Ile His Ala Gly His Arg Leu Tyr Gly Ile Ala Ile Asn Pro Asn

225 230 235 240

Arg Val Phe Lys Val Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Glu Met Ser Gly Leu

245 250 255

Glu Val Ser Phe Glu Glu Leu Arg Thr Phe Gly Gly His Asp Ala Lys

260 265 270

Phe Ile Asp Ser Leu Gln Glu Asn Glu Phe Arg Leu Tyr Tyr Tyr Asn

275 280 285

Lys Phe Lys Asp Ile Ala Ser Thr Leu Asn Lys Ala Lys Ser Ile Val

290 295 300

Gly Thr Thr Ala Ser Leu Gln Tyr Met Lys Asn Val Phe Lys Glu Lys

305 310 315 320

Tyr Leu Leu Ser Glu Asp Thr Ser Gly Lys Phe Ser Val Asp Lys Leu

325 330 335

Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Met Leu Thr Glu Ile Tyr Thr Glu Asp

340 345 350

Asn Phe Val Lys Phe Phe Lys Val Leu Asn Arg Lys Thr Tyr Leu Asn

355 360 365

Phe Asp Lys Ala Val Phe Lys Ile Asn Ile Val Pro Lys Val Asn Tyr

370 375 380

Thr Ile Tyr Asp Gly Phe Asn Leu Arg Asn Thr Asn Leu Ala Ala Asn

385 390 395 400

Phe Asn Gly Gln Asn Thr Glu Ile Asn Asn Met Asn Phe Thr Lys Leu

405 410 415

Lys Asn Phe Thr Gly Leu Phe Glu Phe Tyr Lys Leu Leu Cys Val Arg

420 425 430

Gly Ile Ile Thr Ser Lys Thr Lys Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Asn Lys

435 440 445

Ala Leu Asn Asp Leu Cys Ile Lys Val Asn Asn Trp Asp Leu Phe Phe

450 455 460

Ser Pro Ser Glu Asp Asn Phe Thr Asn Asp Leu Asn Lys Gly Glu Glu

465 470 475 480

Ile Thr Ser Asp Thr Asn Ile Glu Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Leu

485 490 495

Asp Leu Ile Gln Gln Tyr Tyr Leu Thr Phe Asn Phe Asn Glu Pro

500 505 510

Glu Asn Ile Ser Ile Glu Asn Leu Ser Ser Asp Ile Ile Gly Gln Leu

515 520 525

Glu Leu Met Pro Asn Ile Glu Arg Phe Pro Asn Gly Lys Tyr Glu

530 535 540

Leu Asp Lys Tyr Thr Met Phe His Tyr Leu Arg Ala Gln Glu Phe Glu

545 550 555 560

His Gly Lys Ser Arg Ile Ala Leu Thr Asn Ser Val Asn Glu Ala Leu

565 570 575

Leu Asn Pro Ser Arg Val Tyr Thr Phe Phe Ser Ser Asp Tyr Val Lys

580 585 590

Lys Val Asn Lys Ala Thr Glu Ala Ala Met Phe Leu Gly Trp Val Glu

595 600 605

Gln Leu Val Tyr Asp Phe Thr Asp Glu Thr Ser Glu Val Ser Thr Thr

610 615 620

Asp Lys Ile Ala Asp Ile Thr Ile Ile Pro Tyr Ile Gly Pro Ala

625 630 635 640

Leu Asn Ile Gly Asn Met Leu Tyr Lys Asp Asp Phe Val Gly Ala Leu

645 650 655

Ile Phe Ser Gly Ala Val Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro Glu Ile Ala

660 665 670

Ile Pro Val Leu Gly Thr Phe Ala Leu Val Ser Tyr Ile Ala Asn Lys

675 680 685

Val Leu Thr Val Gln Thr Ile Asp Asn Ala Leu Ser Lys Arg Asn Glu

690 695 700

Lys Trp Asp Glu Val Tyr Lys Tyr Ile Val Thr Asn Trp Leu Ala Lys

705 710 715 720

Val Asn Thr Gln Ile Asp Leu Ile Arg Lys Lys Met Lys Glu Ala Leu

725 730 735

Glu Asn Gln Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asn Tyr Gln Tyr Asn

740 745 750

Gln Tyr Thr Glu Glu Lys Asn Asn Ile Asn Phe Asn Ile Asp Asp

755 760 765

Leu Ser Ser Lys Leu Asn Glu Ser Ile Asn Lys Ala Met Ile Asn Ile

770 775 780

Asn Lys Phe Leu Asn Gln Cys Ser Val Ser Tyr Leu Met Asn Ser Met

785 790 795 800

Ile Pro Tyr Gly Val Lys Arg Leu Glu Asp Phe Asp Ala Ser Leu Lys

805 810 815

Asp Ala Leu Leu Lys Tyr Ile Tyr Asp Asn Arg Gly Thr Leu Ile Gly

820 825 830

Gln Val Asp Arg Leu Lys Asp Lys Val Asn

835 840

<210> 31

<211> 863

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 31

Met Pro Val Thr Ile Asn Asn Phe Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Asp Asn

1 5 10 15

Asn Asn Ile Ile Met Met Glu Pro Pro Phe Ala Arg Gly Thr Gly Arg

20 25 30

Tyr Tyr Lys Ala Phe Lys Ile Thr Asp Arg Ile Trp Ile Ile Pro Glu

35 40 45

Arg Tyr Thr Phe Gly Tyr Lys Pro Glu Asp Phe Asn Lys Ser Ser Gly

50 55 60

Ile Phe Asn Arg Asp Val Cys Glu Tyr Tyr Asp Pro Asp Tyr Leu Asn

65 70 75 80

Thr Asn Asp Lys Lys Asn Ile Phe Leu Gln Thr Met Ile Lys Leu Phe

85 90 95

Asn Arg Ile Lys Ser Lys Pro Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Met Ile

100 105 110

Ile Asn Gly Ile Pro Tyr Leu Gly Asp Arg Arg Val Pro Leu Glu Glu

115 120 125

Phe Asn Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Val Asn Lys Leu Ile Ser Asn

130 135 140

Pro Gly Glu Val Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Ala Asn Leu Ile Ile

145 150 155 160

Phe Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Glu Asn Glu Thr Ile Asp Ile Gly

165 170 175

Ile Gln Asn His Phe Ala Ser Arg Glu Gly Phe Gly Gly Ile Met Gln

180 185 190

Met Lys Phe Cys Pro Glu Tyr Val Ser Val Phe Asn Asn Val Gln Glu

195 200 205

Asn Lys Gly Ala Ser Ile Phe Asn Arg Arg Gly Tyr Phe Ser Asp Pro

210	215	220
Ala Leu Ile Leu Met His Glu Leu Ile His Val Leu His Gly Leu Tyr		
225	230	235
Gly Ile Lys Val Asp Asp Leu Pro Ile Val Pro Asn Glu Lys Lys Phe		
245	250	255
Phe Met Gln Ser Thr Asp Ala Ile Gln Ala Glu Glu Leu Tyr Thr Phe		
260	265	270
Gly Gly Gln Asp Pro Ser Ile Ile Thr Pro Ser Thr Asp Lys Ser Ile		
275	280	285
Tyr Asp Lys Val Leu Gln Asn Phe Arg Gly Ile Val Asp Arg Leu Asn		
290	295	300
Lys Val Leu Val Cys Ile Ser Asp Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ile Tyr		
305	310	315
Lys Asn Lys Phe Lys Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Asp Ser Glu Gly		
325	330	335
Lys Tyr Ser Ile Asp Val Glu Ser Phe Asp Lys Leu Tyr Lys Ser Leu		
340	345	350
Met Phe Gly Phe Thr Glu Thr Asn Ile Ala Glu Asn Tyr Lys Ile Lys		
355	360	365
Thr Arg Ala Ser Tyr Phe Ser Asp Ser Leu Pro Pro Val Lys Ile Lys		
370	375	380
Asn Leu Leu Asp Asn Glu Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Gly Phe Asn Ile		
385	390	395
Ser Asp Lys Asp Met Glu Lys Glu Tyr Arg Gly Gln Asn Lys Ala Ile		
405	410	415
Asn Lys Gln Ala Tyr Glu Glu Ile Ser Lys Glu His Leu Ala Val Tyr		
420	425	430
Lys Ile Gln Met Cys Lys Ser Val Lys Ala Pro Gly Ile Cys Ile Asp		
435	440	445
Val Asp Asn Glu Asp Leu Phe Phe Ile Ala Asp Lys Asn Ser Phe Ser		
450	455	460

Asp Asp Leu Ser Lys Asn Glu Arg Ile Glu Tyr Asn Thr Gln Ser Asn
 465 470 475 480

Tyr Ile Glu Asn Asp Phe Pro Ile Asn Glu Leu Ile Leu Asp Thr Asp
 485 490 495

Leu Ile Ser Lys Ile Glu Leu Pro Ser Glu Asn Thr Glu Ser Leu Thr
 500 505 510

Asp Phe Asn Val Asp Val Pro Val Tyr Glu Lys Gln Pro Ala Ile Lys
 515 520 525

Lys Ile Phe Thr Asp Glu Asn Thr Ile Phe Gln Tyr Leu Tyr Ser Gln
 530 535 540

Thr Phe Pro Leu Asp Ile Arg Asp Ile Ser Leu Thr Ser Ser Phe Asp
 545 550 555 560

Asp Ala Leu Leu Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Phe Phe Ser Met Asp
 565 570 575

Tyr Ile Lys Thr Ala Asn Lys Val Val Glu Ala Gly Leu Phe Ala Gly
 580 585 590

Trp Val Lys Gln Ile Val Asn Asp Phe Val Ile Glu Ala Asn Lys Ser
 595 600 605

Asn Thr Met Asp Lys Ile Ala Asp Ile Ser Leu Ile Val Pro Tyr Ile
 610 615 620

Gly Leu Ala Leu Asn Val Gly Asn Glu Thr Ala Lys Gly Asn Phe Glu
 625 630 635 640

Asn Ala Phe Glu Ile Ala Gly Ala Ser Ile Leu Leu Glu Phe Ile Pro
 645 650 655

Glu Leu Leu Ile Pro Val Val Gly Ala Phe Leu Leu Glu Ser Tyr Ile
 660 665 670

Asp Asn Lys Asn Lys Ile Ile Lys Thr Ile Asp Asn Ala Leu Thr Lys
 675 680 685

Arg Asn Glu Lys Trp Ser Asp Met Tyr Gly Leu Ile Val Ala Gln Trp
 690 695 700

Leu Ser Thr Val Asn Thr Gln Phe Tyr Thr Ile Lys Glu Gly Met Tyr

705 710 715 720

Lys Ala Leu Asn Tyr Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ile Ile Lys Tyr

725 730 735

Arg Tyr Asn Ile Tyr Ser Glu Lys Glu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Asp

740 745 750

Phe Asn Asp Ile Asn Ser Lys Leu Asn Glu Gly Ile Asn Gln Ala Ile

755 760 765

Asp Asn Ile Asn Asn Phe Ile Asn Gly Ser Val Ser Tyr Leu Met

770 775 780

Lys Lys Met Ile Pro Leu Ala Val Glu Lys Leu Leu Asp Phe Asp Asn

785 790 795 800

Thr Leu Lys Lys Asn Leu Leu Asn Tyr Ile Asp Glu Asn Lys Leu Tyr

805 810 815

Leu Ile Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Lys Val Asn Lys Tyr Leu

820 825 830

Lys Thr Ile Met Pro Phe Asp Leu Ser Ile Tyr Thr Asn Asp Thr Ile

835 840 845

Leu Ile Glu Met Phe Asn Lys Tyr Asn Ser Glu Ile Leu Asn Asn

850 855 860

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 32

Ser Ser Ser Arg

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 33

Ser Ser Ser Ser

1

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 34

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile

1

5

10

15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala

20

25

<210> 35

<211> 141

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 35

Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser

1

5

10

15

Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly

20

25

30

Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr

35

40

45

Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp

50

55

60

Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr

65

70

75

80

Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser

85

90

95

Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr

100	105	110
Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys		
115	120	125
Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly		
130	135	140
<210> 36		
<211> 141		
<212> PRT		
<213> Bacillus anthracis		
<400> 36		
Arg Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser		
1	5	10
15		
Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly		
20	25	30
Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr		
35	40	45
Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp		
50	55	60
Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr		
65	70	75
80		
Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser		
85	90	95
Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr		
100	105	110
Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys		
115	120	125
Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly		
130	135	140
<210>		
37		
<211> 140		
<212> PRT		
<213> Bacillus anthracis		

<400> 37

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 1 5 10 15
 Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
 20 25 30

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
 35 40 45
 Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg

50 55 60
 Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
 65 70 75 80
 Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
 85 90 95
 Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
 100 105 110
 Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys

115 120 125
 Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
 130 135 140

<210> 38

<211> 140

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 38

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 1 5 10 15
 Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
 20 25 30

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile

35 40 45
 Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
 50 55 60

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
 65 70 75 80
 Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
 85 90 95
 Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
 100 105 110
 Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
 115 120 125
 Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
 130 135 140
 <210> 39
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> *Bacillus anthracis*
 <400> 39
 Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn
 20 25 30
 Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val
 35 40 45
 Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly
 50 55 60
 Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys
 65 70 75 80
 Gly Tyr Glu Ile Gly
 85
 <210
 > 40
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> *Bacillus anthracis*
 <400> 40

Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn
 20 25 30
 Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val
 35 40 45
 Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly

 50 55 60
 Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys
 65 70 75 80
 Gly Tyr Glu Ile Gly
 85

<210> 41
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 41
 Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 1 5 10 15

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
 20 25 30
 Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
 35 40 45
 Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

50 55
 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 42

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

1 5

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 43

Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp

1 5 10 15

Thr Glu

<210> 44

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 44

Ser Thr Glu Gly Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile

1 5 10 15

Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

20 25

<210> 45

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 45

Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile

1 5 10 15
 Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg

20 25 30
 Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

35 40 45

<210> 46

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 46

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 1 5 10 15

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu

20 25 30
 Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile

35 40 45

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg

50 55 60

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe

65 70 75 80

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn

85 90 95

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
 100 105 110

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
 115 120 125

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly

130 135 140

<210> 47

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 47

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg

1 5 10 15

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe

20 25 30

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn

35 40 45

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile

50 55 60

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys

65 70 75 80

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly

85 90

<210> 48

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 48

Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp

1 5 10 15

Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn

20 25 30

Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys

35 40 45

Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val

50 55 60

Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu
 65 70 75 80

Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser
 85 90 95
 Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
 100

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 49

Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu

20 25 30

Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln
 35 40 45

Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro
 50 55 60

Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr
 65 70 75 80

Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr

85 90 95

Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile
 100 105 110
 Gly

<210> 50

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 50

Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile

1 5 10 15

Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg

20 25 30

Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu

35 40 45

Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu

50 55 60

Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys

65 70 75 80

Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala

85 90 95

Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr

100 105 110

Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr

115 120 125

Glu Ile Gly

130

<210> 51

<211> 27

<212> PRT

<213> Conus sp.

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Hyp

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Hyp

<220><221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Hyp

<400> 51

Cys Lys Ser Xaa Gly Ser Ser Cys Ser Xaa Thr Ser Tyr Asn Cys Cys

1 5 10 15

Arg Ser Cys Asn Xaa Tyr Thr Lys Arg Cys Tyr

20 25

<210> 52

<211> 26

<212> PRT

<213> Conus sp.

<400> 52

Cys Lys Gly Lys Gly Ala Pro Cys Arg Lys Thr Met Tyr Asp Cys Cys

1 5 10 15

Ser Gly Ser Cys Gly Arg Arg Gly Lys Cys

20 25

<210> 53

<211> 48

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Omega-Agatoxin IVA polypeptide

<400> 53

Lys Lys Lys Cys Ile Ala Lys Asp Tyr Gly Arg Cys Lys Trp Gly Gly

1 5 10 15

Thr Pro Cys Cys Arg Gly Arg Cys Ile Cys Ser Ile Met Gly Thr

20 25 30

Asn Cys Glu Cys Lys Pro Arg Leu Ile Met Glu Gly Leu Gly Leu Ala

35 40 45

<210> 54

<211> 48

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Omega-Agatoxin TK polypeptide

<400> 54

Glu Asp Asn Cys Ile Ala Glu Asp Tyr Gly Lys Cys Thr Trp Gly Gly

1 5 10 15

Thr Lys Cys Cys Arg Gly Arg Pro Cys Arg Cys Ser Met Ile Gly Thr

20 25 30

Asn Cys Glu Cys Thr Pro Arg Leu Ile Met Glu Gly Leu Ser Phe Ala

35 40 45

<210> 55

<211> 35

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Chinese bird spider polypeptide

<400> 55

Glu Cys Leu Glu Ile Phe Lys Ala Cys Asn Pro Ser Asn Asp Gln Cys

1 5 10 15

Cys Lys Ser Ser Lys Leu Val Cys Ser Arg Lys Thr Arg Trp Cys Lys

20 25 30

Tyr Gln Ile

35

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 56

Tyr Cys Gln Lys Trp Met Trp Thr Cys Asp Ser Glu Arg Lys Cys Cys

1 5 10 15

Glu Gly Met Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Lys Lys Leu Trp

20 25 30

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(24)

<223> This sequence may encompass 1-8 'Gly Gly Ser'
repeating units wherein some positions may be absent

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments

<400> 57

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

20

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 58

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 59

Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 61

His His His His His His

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 62

His His His His His His His

1 5

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 63

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 64

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 65

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 65

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val

1 5 10 15

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu

20 25 30

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile

35 40 45

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

50 55

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 66

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

1 5

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 67

Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp

1 5 10 15

Thr Glu

<210> 68

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 68

Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile

1 5 10 15

Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu

20 25

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 69

Glu Val Lys Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser
 1 5 10

<210> 70

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 70

Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile
 1 5 10 15

Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg
 20 25 30

Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu
 35 40 45

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 71

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 72

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr

1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 73

Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys

1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 74

Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys

1 5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 75

Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 76

Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 77

Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 78

Glu Thr Ser Ala Ala Lys Ile

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 79

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr

1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

IgA protease peptide

<400> 80

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Antarease peptide

<400> 81

Ile Lys Arg Lys Tyr Trp Trp

1 5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 82

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 83

Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 84

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 85

Phe Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 86

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 87

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Ile

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 88

Glu Ala Asn Lys Ala Thr Lys

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 89

Glu Ala Asn Lys His Ala Thr

1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 90

Glu Ala Asn Lys His Ala Asn

1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 91

Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala

1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 92

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr

1 5

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 93

Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys

1 5

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 94

Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met

1 5

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 95

Ala Asn Gln Arg Ala Ile Lys

1 5

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 96

Ala Asn Gln Arg Ala His Gln

1 5

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 97

Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys

1 5

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 98

Lys Thr Lys Lys Ala Val Lys

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 99

Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys

1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 100

Glu Thr Lys Arg Ala Met Lys

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 101

Asp Thr Lys Lys Ala Val Arg

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 102

Asp Thr Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 103

Asp Thr Lys Lys Ala Met Lys

1 5

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 104

Glu Ser Lys Lys Ala Val Lys

1 5

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 105

Glu Thr Lys Lys Ala Met Lys

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 106

Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys

1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 107

Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu

1 5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 108

Gln Ile Gln Lys Ile Thr Glu

1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 109

Gln Ile Asp Arg Ile Val Glu

1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 110

Gln Phe Asp Arg Ile Met Asp

1 5

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 111

Gln Phe Asp Arg Ile Met Glu

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 112

Gln Leu Asp Arg Ile His Asp

1 5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 113

Gln Ile Asp Arg Ile Met Asp

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 114

Gln Val Asp Arg Ile Gln Gln

1 5

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 115

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 116

Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 117

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ser

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 118

Gln Ala Ser Gln Phe Glu Ser

1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 119

Gly Ala Ser Gln Gly Glu Thr

1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 120

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gln

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 121

Gln Ala Ser Gln Phe Glu Ala

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 122

Gly Ala Ser Gln Phe Gln Gln

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 123

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ala

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 124

Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu

1 5

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 125

Arg Asp Gln Lys Ile Ser Glu

1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 126

Lys Asp Gln Lys Leu Ala Glu

1 5

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 127

Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 128

Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 129

Glu Arg Asp Gln Lys Ile Ser

1 5

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 130

Glu Arg Asp Gln Ala Leu Ser

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 131

Glu Lys Asp Gln Lys Leu Ala

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 132

Glu Ser Ser Ala Ala Lys Ile

1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 133

Glu Thr Ser Ala Ala Lys Ile

1 5

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 134

Glu Ser Ser Ala Ala Lys Leu

1 5

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium botulinum

<400> 135

Glu Thr Ser Ala Ala Lys Leu

1 5

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 136

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr

1 5

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 137

Gly Ala Ser Gln Gly Glu Thr

1 5

<210>

138

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 138

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Gln

1 5

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 139

Gln Ala Ser Gln Phe Glu Ala

1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 140

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ser

1 5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 141

Gln Ala Ser Gln Phe Glu Ser

1 5

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 142

Gly Ala Ser Gln Phe Gln Gln

1 5

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 143

Gly Ala Ser Gln Phe Glu Ala

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

IgA protease peptide

<400> 144

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1 5

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><

223> Description of Unknown:

Antarease peptide

<400> 145

Ile Lys Arg Lys Tyr Trp Trp

1 5

<210> 146

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 146

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly

20

<210> 147

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(40)

<223> This sequence may encompass 1-8 'Gly Gly Gly Gly Ser'

repeating units wherein some positions may be absent

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 147

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

35 40

<210> 148

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 148

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5